



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *ESCHERICHIA COLI* EM AMOSTRAS DE
ORIGEM FECAL E VAGINAL DE CADELAS

BEATRIZ LEITÃO PINHÃO LOURENÇO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro
de Oliveira

Doutora Luisa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Ana Catarina Belejo Mora Torres

ORIENTADORA

Doutora Luisa Maria Freire Leal Mateus

2017

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *ESCHERICHIA COLI* EM
AMOSTRAS DE ORIGEM FECAL E VAGINAL DE CADELAS

BEATRIZ LEITÃO PINHÃO LOURENÇO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro
de Oliveira

Doutora Luisa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Ana Catarina Belejo Mora Torres

ORIENTADORA

Doutora Luisa Maria Freire Leal Mateus

2017

LISBOA

Às que partiram antes de me verem chegar aqui, nunca esquecidas

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos...

Começo por agradecer à Professora Doutora Luísa Mateus, por me ter aceite nesta caminhada, e me ter confiado este projecto. Muito obrigada por tudo o que tive oportunidade de aprender consigo e por todo o tempo que me dedicou. À Jasmim, que se pudesse falar, provavelmente diria que já não me pode ver à frente.

À Doutora Elisabete Silva, que todos os dias embirrou com a minha roupa, mas que todos os dias, à sua maneira (e se calhar sem se aperceber), me deu força para continuar. Muito obrigada por toda a paciência, preocupação e disponibilidade demonstradas. Prometo vir chatear-te sempre que possível, e trazer-te um bolo de tempos em tempos.

Ao laboratório de Microbiologia, e ao Professor Ricardo Bexiga, por ter permitido a utilização das suas instalações e equipamentos para a elaboração deste trabalho.

À Mestre Carla Carneiro, a minha lufada de ar fresco laboratorial, que me fez ver as coisas boas quando tudo parecia muito negro. Obrigada por tudo o que me ensinaste, ajudaste e auxiliaste. És a positividade em pessoa!

À Mestre Marta Silva, por ter aparecido numa fase já tardia do trabalho mas se ter mostrado tão marcante neste percurso final. És um exemplo de força e audácia. Levo-te com muito carinho. Obrigada por tudo!

À Mestre Patrícia Diniz, por ter sido sempre tão querida e paciente comigo. Obrigada por teres tido, muitas vezes, a palavra certa que precisava de ouvir.

À minha colega de percurso Inês Machado, por ter partilhado a sua dor comigo!

Ao Mestre Gonçalo Pereira, pela ajuda na formatação deste trabalho, mas mais do que isso, pelos momentos de simpatia e descontração!

A todo o departamento de Reprodução e Obstetrícia que me recebeu tão bem, em especial à Mariana Batista, por toda a ajuda e boa disposição.

À Dr.^a Adriana Alberto pela simpatia e por toda a ajuda na obtenção das amostras, indispensáveis à realização deste trabalho.

Ao Professor Telmo Nunes, por se ter dividido em 30 e me ter conseguido ajudar na análise estatística dos resultados. Sem dúvida, uma ajuda preciosa!

À Doutora Teresa Semedo, pela ajuda na análise dos resultados do Rep-PCR. Agradeço também à Professora Doutora Maria João Fraqueza por nos ter disponibilizado o seu gabinete para que pudéssemos trabalhar. Muito obrigada!

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) pelo apoio financeiro concedido e por ter permitido a utilização das suas instalações e equipamentos para a elaboração deste trabalho. Agradeço também a todos os que trabalham no laboratório pela simpatia com que me receberam.

Aos criadores e as suas cadelas pela colaboração neste estudo.

Ao Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, por me ter acolhido durante alguns dos melhores meses desta caminhada que foi o meu curso.

A todos os médicos, enfermeiros, auxiliares e recepcionistas do HEV-FMV! Sem vocês, este estágio não teria sido o mesmo.

Ao Gonçalo Vicente um agradecimento muito especial. Uma das pessoas que mais aturou de mim, com quem mais ri e chorei durante o estágio, e depois dele. Obrigada por tudo o que me ensinaste, mas mais do que isso, por toda a amizade e cumplicidade. És sem dúvida uma amizade que levo para a vida.

Às minhas enfermeiras do coração, Patrícia, Margarida, Raquel, Carla S. e Rita! No dia em que abrir um Hospital Veterinário, alugo uma limusine para vos levar directamente para lá. Mais do que excelentes profissionais, são amigas com quem ri em muitas horas de almoço e com quem não perderei contacto, prometam-me!

Ao Sr. Álvaro e à Dona Fernanda, por fazerem desta casa que é o Hospital um lugar melhor. Obrigada por todos os sorrisos e abraços!

À Bia Vila Nova, entrámos como colegas de estágio, saímos como amigas de verdade. Não vou nunca saber explicar aos outros como te vejo, és boa demais para conseguir descrever-te. Obrigada por tantas coisas boas que me deste. Uma delas a nossa Neves, a quem também tenho que agradecer!

Ao Tony, pela ajuda, apoio e motivação que sempre me deu. Por sempre me ter lembrado do porquê de ter começado.

À Maria Francisca, “a minha pessoa”, que este curso me deu e que guardo no coração. Foste provavelmente a melhor coisa que a viagem até Lisboa me deu. Obrigada por me confiares a tua mais sincera amizade.

À pulga Marisa! À única que entende o meu humor, e com quem consigo rir da coisa mais estúpida do Universo. Obrigada, mais do que tudo, por te teres cruzado no meu caminho.

Às minhas amigas de infância, Teresa, Pipi, Carolina O., Carolina B., Joana e Cristiana por terem assistido de perto a este percurso académico e estarem sempre prontas a ouvir-me reclamar ou gargalhar sobre tudo o que levei destes anos.

A uma das minhas razões de viver, Bárbara. Uma das razões pela qual me levanto todos os dias a tentar ser uma pessoa melhor. Não há palavras para te agradecer tudo o que me dás e me és. Obrigada por seres a minha fonte de inspiração e por me guiares sempre. Sabes que és um dos meus pilares.

Mariana, a minha outra razão de viver. Obrigada por existires. Por seres um dos meus maiores amores. Por ser tão fácil amar-te e por querer ser melhor só para te orgulhar. O orgulho que já tenho em ti, minha mini-eu. Outro pilar meu.

Aos meus pais, por serem os melhores do mundo. Obrigada por me fazerem sentir sempre apoiada e nunca sozinha. Sei que independentemente do caminho que decida seguir, o vosso colo vai ser sempre a minha casa. Obrigada por acreditarem tanto em mim, e nunca me deixarem sentir desamparada.

Ao meu avô, por ser tão bom e tão essencial para mim. Sei o quanto ficas orgulhoso.

À minha madrinha e ao meu afilhado, por serem o meu consolo quando me vou abaixo. Por me receberem sempre com o seu melhor sorriso e me mostrarem que rir é sempre o melhor remédio.

Ao Edgar, por ser a minha consciência quando começo a levantar os pés do chão. Sonhar é bom, mas sonhar com inteligência leva-nos mais longe, por mais tempo.

Ao Guilherme! O Guilherme que me atura e me pacifica num abraço apertado. Que os teus braços sejam sempre o meu porto de abrigo, e que os meus te abracem sempre que o permitas.

Por último, aos meus sonhos. Ao Booggie, em especial, por ter sido o melhor cão que podia ter pedido e por me ter acompanhado desde que me lembro, até muito recentemente. Obrigada por teres aguentado tanto e quase me teres visto chegar aqui. Ficaste até te ter sido possível, e não podia ter pedido mais de ti. Este sonho também se deve a ti. À Juma, ao Banzé, à Mimi, ao Romeu, à Julieta, à Noa, ao Balu, ao Vicente, ao Mateus, ao Rex, ao Simba, à Poupas, e a tantos outros patudos que passaram na minha vida e me deixaram rendida a esta profissão. Todos os que me conhecem desde criança sabem que ser médica veterinária é um sonho antigo, e é muito graças a todos vós que estou prestes a concretizá-lo. Por tudo isto, muito obrigada!

RESUMO

Análise da estrutura populacional de *Escherichia coli* em amostras de origem fecal e vaginal de cadelas

Escherichia coli é a bactéria mais prevalente na microbiota fecal de cães saudáveis e o agente bacteriano mais associado a infecções extra-intestinais (ExPEC). Apesar de pouco estudada, a análise da estrutura da população de *E. coli* no intestino de indivíduos saudáveis poderá ajudar no conhecimento e controlo das infecções por ExPEC. Neste estudo fez-se uma análise da estrutura populacional de *E. coli* presente na microbiota fecal e vaginal da cadela, em duas fases do ciclo éstrico, estro e diestro, com o objectivo de avaliar: a) a prevalência dos diferentes grupos filogenéticos (GFs); b) a diversidade dos clones na população fecal e vaginal (identificação de amostras pauciclonaes/multiclonaes e de clones dominantes); c) a persistência dos diferentes clones na microbiota fecal e vaginal. Foram colhidas zaragatoas fecais e vaginaes de 30 cadelas saudáveis, e feita a caracterização filogenética e clonal, tendo sido analisados 191 isolados de origem vaginal e 581 de origem fecal. Os nossos dados demonstraram que a microbiota fecal é bastante heterogénea entre hospedeiros, no que diz respeito ao número de clones identificados (10% das cadelas apresentaram um único clone e 90% entre 2 e 16 clones). Os clones de *E. coli* pertencentes ao GF B2 foram os mais prevalentes ($p < 0,0001$), tanto nas amostras de origem vaginal como fecal. Foi também demonstrado uma associação positiva entre GF B2, dominância clonal e pauciclonaesidade. Os clones do GF B2 são mais persistentes na microbiota fecal, uma vez que a presença de clones B2 em diestro esteve associada à presença do mesmo clone em estro com uma razão de verosimilhança de 28,89 (IC 95% [1,9-434,5]; $p = 0,015$). ($p < 0,05$). No entanto, a presença de um clone na microbiota vaginal na fase de diestro está associado à sua presença no estro, independentemente do GF a que pertence. Uma vez que *E. coli* do GF B2, o grupo com maior potencial de virulência, é a mais frequentemente isolada em casos de piómetra na cadela, este estudo sugere que a trilogia pauciclonaesidade/menor dominância/menor potencial de virulência está relacionada com a maior probabilidade dos clones do GF B2 causarem piómetra em hospedeiros susceptíveis.

Palavras-chave: Cadelas, ciclo éstrico, amostra fecal e vaginal, *Escherichia coli*, análise clonal, grupo filogenético.

ABSTRACT

Analysis of the population structure of *Escherichia coli* in samples of fecal and vaginal origin of bitches

Escherichia coli (*E. coli*) is the most prevalent bacterium in the fecal microbiota of healthy dogs and the *most common bacterial isolate associated with* extra-intestinal infections. Although not well studied, analysis of *E. coli* population structure in the gut of healthy individuals can generate knowledge that may contribute to the control of extra-intestinal infections. In this study, the *E. coli* population structure present in the fecal and vaginal microbiota of bitches was analyzed, in two phases of the estrous cycle, estrus and diestrus, in order to evaluate the: a) prevalence of different phylogenetic groups (PGs); b) clones diversity (identification of pauciclonal/multiclonal samples and dominant clones); c) persistence of the identified clones (presence of the same clone at estrus and diestrus). Fecal and vaginal swabs were collected from 30 healthy bitches, and phylogenetic and clonal characterization was performed, with a total of 191 isolates of vaginal origin and 581 of fecal origin analyzed. Our data demonstrate that fecal microbiota is quite heterogeneous among hosts (10% of dogs showed a single clone and 90% between 2 and 16 clones). *E. coli* clones belonging to PG B2 were the most prevalent ($p < 0.0001$), both in vaginal and fecal samples. A positive association between PG B2, clonal dominance and pauciclonality was also demonstrated. Persistent of PG B2 clones in the fecal microbiota has been shown, as the presence of B2 clones in diestrus was associated with the presence of the same clone in estrus with an Odds Ratio of 28,89 (IC 95% [1,9-434,5]; $p=0,015$). However, the presence of a clone in the vaginal microbiota in diestrus was associated with its presence in estrus, regardless of the PG. It is well recognized that highly pathogenic *E. coli* of PG B2 is the most commonly isolated bacteria from canine pyometra cases. Here, we showed that the trilogy pauciclonality/clonal dominance/virulence is possibly related with the higher probability of B2 clones to cause pyometra in susceptible hosts.

Key words: Bitch, Estrous cycle, fecal and vaginal samples, *Escherichia coli*, clonal analysis, phylogenetic group

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	1
INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS.....	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1- Microbiota intestinal, um reservatório de <i>Escherichia coli</i> patogénica.....	4
2- Microbiota vaginal.....	5
3- <i>Escherichia coli</i>	5
3.1. Factores de virulência.....	6
3.2. Grupos filogenéticos.....	8
4- Métodos moleculares de tipagem bacteriana.....	9
4.1. Rep-PCR.....	10
5- <i>E. coli</i> como bactéria responsável pelo desenvolvimento de piómetra.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS	
6- Colheita das amostras	
6.1. Cadelas.....	13
6.2. Amostras de origem fecal e vaginal.....	13
7- Caracterização das amostras	
7.1. Isolamento e identificação de <i>E. coli</i>	13
7.2. Avaliação do fenótipo.....	14
8- Extracção de ADN e técnicas de PCR	
8.1. Extracção de ADN.....	14
8.2. Estirpes de referência utilizadas nas técnicas de PCR.....	15
8.3. Identificação do grupo filogenético por Multiplex PCR.....	15
8.4. Tipificação Genómica por Rep-PCR.....	15
9- Análise estatística.....	16
RESULTADOS.....	17
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do método de Rep-PCR	11
Figura 2 – Dendrograma representativo de uma amostra pauciclonal (quatro clones) com 20 isolados de origem vaginal e 18 de origem fecal, pertencentes ao GF B2 distribuídos por três clones, e um isolado de origem fecal do GF A.....	35
Figura 3 – Dendrograma representativo de uma amostra com 20 isolados de origem fecal e 10 de origem vaginal pertencentes aos diferentes GF	38
Figura 4 – Dendrograma representativo de uma amostra pauciclonal (dois clones) com 20 isolados de origem fecal pertencentes ao GF B2.....	39
Figura 5 – Dendrograma representativo de uma amostra multiclonal (13 clones) com 17 isolados de origem fecal e 10 isolados de origem vaginal pertencentes aos vários GF.....	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização dos diferentes métodos de tipagem de ADN.....	10
Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para determinação do GF.....	15
Tabela 3 – Distribuição dos isolados de <i>E. coli</i> de origem fecal em estro.....	17
Tabela 4 – Distribuição do número de isolados dos diferentes GFs por cadela, de origem fecal em estro.....	18
Tabela 5 – Distribuição dos 103 clones de <i>E. coli</i> de origem fecal entre as 30 cadelas em estro.....	19
Tabela 6 – Distribuição do número de clones por fenótipo e filogenia	19
Tabela 7 – Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs.....	20
Tabela 8 – Número de isolados de <i>E.coli</i> de origem vaginal de cadelas em estro	21
Tabela 9 – Distribuição do número de isolados dos diferentes GFs por cadela, de origem vaginal em estro.....	22
Tabela 10 – Distribuição dos 16 clones de <i>E. coli</i> de origem vaginal entre as 11 cadelas em estro	22
Tabela 11 – Representação do número de clones de cada filogenia e fenótipo, por cadela.....	23
Tabela 12 – Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs	23
Tabela 13 - Número de isolados de <i>E. coli</i> de origem fecal em diestro	25
Tabela 14 – Distribuição do número de isolados dos diferentes GFs por cadela, de origem fecal em diestro.....	26
Tabela 15 – Distribuição dos 99 clones de <i>E. coli</i> de origem fecal entre as 30 cadelas em diestro	27
Tabela 16 – Distribuição do número de clones por fenótipo e filogenia	28
Tabela 17 – Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs.....	28
Tabela 18 –Número de isolados de <i>E. coli</i> de origem vaginal em diestro	29
Tabela 19 – Distribuição do número de isolados dos diferentes GFs por cadela, de origem vaginal em estro.....	30
Tabela 20 – Distribuição dos 18 clones de <i>E. coli</i> de origem vaginal entre as 10 cadelas em diestro.....	30
Tabela 21 – Distribuição do número de clones por fenótipo e filogenia.....	31
Tabela 22 – Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs	31
Tabela 23 – Número de isolados de <i>E. coli</i> de origem fecal e vaginal em estro e diestro.....	33
Tabela 24 – Associação entre GFs e fenótipo dos isolados de origem fecal e vaginal em estro e diestro... ..	34
Tabela 25 - Distribuição dos 190 clones de <i>E. coli</i> de origem fecal e vaginal entre as 30 cadelas em estro e diestro.	36
Tabela 26 – Distribuição do número de clones por fenótipo e filogenia em estro e diestro.....	37
Tabela 27 – Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs.....	37

ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
° C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>
ARNr	Ácido ribonucleico ribossomal
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CFLP	<i>Cleavase fragment length polymorphism</i>
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CNF-1	Factor citotóxico necrosante 1
COS	Agar Columbia com 5% de sangue de carneiro
DF	Fase de diestro e de origem fecal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DV	Fase de diestro e de origem vaginal
EF	Fase de estro e de origem fecal
ERIC	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
EV	Fase de estro e de origem vaginal
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogénica extraintestinal
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
FV	Factor de virulência
GF	Grupo filogenético
h	Hora
H	Hemolítico
HEFMV	Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária
HlyA	α-hemolisina
InPEC	<i>E. coli</i> patogénica intestinal
ITU	Infecção do trato urinário
LB	Luria-Bertani
LH	Hormona luteinizante
LPS	Lipopolissacárido
M	Mucóide
MCK	Agar MacConkey
mg	Miligramma
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
min	Minuto
mM	Milimolar
ng	Nanograma
NH	Não hemolítico
NM	Não mucóide
NMEC	Neonatal meningitis-associated <i>E. coli</i>
P4	Progesterona
PAI	Ilha de patogenicidade
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
RAPD	<i>Randomly amplified polymorphic DNA Fingerprints</i>
REP	<i>Repetitive extragenic palindromic elements</i>
Rep-PCR	<i>Repetitive element sequence-based</i>

RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphisms</i>
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
SEPEC	<i>Sepsis-associated E. coli</i>
Sp	<i>Species</i>
Spp	<i>Species pluralis</i>
UPEC	<i>Uropathogenic E. coli</i>
UV	Ultra-violeta
vs.	<i>Versus</i>

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular foi dividido em duas áreas: na área de clínica e cirurgia no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV), Universidade de Lisboa, e na área de investigação no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), sob orientação da Professora Luísa Mateus.

O estágio na área clínica e cirúrgica teve início em Fevereiro de 2016 e terminou em Setembro do mesmo ano. Durante este período, tive a oportunidade de passar pelos vários serviços do Hospital, nomeadamente pela Medicina interna, internamento, imagiologia e cirurgia. O horário do estágio variou consoante os diferentes serviços, tendo uma duração diária média de 8 horas, excepto no internamento, cujos turnos eram de 12 horas.

No serviço de Medicina interna acompanhei primeiras consultas, consultas de seguimento e também de referência em várias áreas como a oncologia, reprodução e obstetrícia, oftalmologia, dermatologia e ortopedia.

Nas consultas de medicina interna tive a oportunidade de fazer a recolha da anamnese e exame físico, com posterior discussão com o médico veterinário responsável acerca dos possíveis diagnósticos diferenciais, plano de diagnóstico e terapêuticas mais adequadas. Durante estes meses foi possível, sob supervisão, realizar colheitas de sangue, vacinação, colocação de microchip, algaliação, colocação de pensos e cateteres, microhematócritos, entre outros. O contacto com os tutores dos animais permitiu-me melhorar a comunicação com os mesmos, sendo um factor muito importante para uma boa recolha da história pregressa dos animais.

No serviço de internamento monitorizei os animais internados, preparei e administrei medicações e fui responsável pela alimentação, passeio e cuidados de higiene dos animais. Pude ainda aperfeiçoar técnicas de abordagem aos animais, bem como de contenção para exames físicos e administração de medicamentos/alimento. Na mudança de turno dos médicos responsáveis pelo internamento, tive a oportunidade de assistir e discutir a passagem de casos clínicos dos animais, ajudando-me na interpretação dos mesmos, e no esclarecimento de dúvidas sobre os mesmos.

Na imagiologia, recebi os animais e monitorizei a anestesia dos que tinham indicação para a mesma, posicionei os animais da forma mais indicada consoante a projecção adequada e discuti com os médicos veterinários os achados imagiológicos, de forma a chegarmos a um diagnóstico.

Na cirurgia, passei pelas várias fases que esta implica, desde receber o animal e contactar com os tutores, com os devidos esclarecimentos de dúvidas existentes, passando pela preparação do animal para a cirurgia, pela cirurgia propriamente dita, e terminando com o acordar do animal no recobro. Neste serviço tive a oportunidade de ajudar o cirurgião, tendo realizado várias técnicas como suturas e limpeza e desinfeção de feridas. Tive a

possibilidade de assistir e ajudar em várias cirurgias, tais como ovariohisterectomias, orquiectomias, cistotomias, cesarianas, entre outras.

Durante estes seis meses, somando todos os serviços pelos quais passei, consolidei seis anos de conhecimentos na prática clínica, e pude associar a teoria à prática da medicina veterinária. Além de conhecimentos profissionais, aprendi a trabalhar em equipa com médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares, que me ajudaram sempre que precisei, e ajudei sempre que pude.

O estágio na área de investigação decorreu entre Fevereiro de 2016 e Janeiro de 2017, no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA).

Durante este estágio em Investigação Científica, foi desenvolvido o trabalho que constituiu a base da dissertação de Mestrado Integrado. Ao longo destes meses adquiri conhecimentos numa área pouco explorada durante o curso de Medicina Veterinária. Foi com a colaboração da Professora Luísa Mateus, da Doutora Elisabete Silva, e da Mestre Carla Carneiro que aprendi diversas técnicas de laboratório.

Neste estágio adquiri conhecimentos e experiência que até então não tinha muito consolidados. Desenvolvi várias técnicas na área de microbiologia e de biologia molecular tais como propagação de amostras em meios sólido e líquido, isolamento e identificação da bactéria, extracção de ácido desoxirribonucleico (ADN), reacção em cadeia da polimerase (PCR) convencional e electroforese de produtos de PCR em géis de agarose. Aprendi a caracterizar o fenótipo, a filogenia e executar a técnica de REP-PCR em *Escherichia coli* (*E. coli*), e a interpretar dendrogramas. Com o Professor Telmo Nunes, aprofundei conhecimentos na área da estatística, importantes para avaliação correcta dos resultados obtidos.

No fundo, adquiri os conhecimentos na área da biologia molecular imprescindíveis para a execução do trabalho incluído na dissertação de mestrado.

INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Escherichia coli (*E. coli*) é uma das bactérias de Gram-negativo mais prevalentes na microbiota das fezes da maioria dos mamíferos. Apesar de assumir um carácter comensal na maioria dos casos, existem estirpes que possuem características que lhes dão uma maior capacidade de causar doença fora do intestino, designadas de *Escherichia coli* patogénica extraintestinal (ExPEC). Na cadela, estas estirpes causam, frequentemente, duas doenças associadas ao tracto urogenital. São estas a infecção do tracto urinário (ITU) e a piómetra. Permanece ainda por esclarecer se as estirpes de *E. coli* que causam doença fora do intestino, são o clone fecal/vaginal mais prevalente (*prevalence theory*) ou se existe uma sub-população de bactérias especializadas, que possuem um maior número de determinantes de virulência que lhe permite causar doença fora do intestino (*special-pathogenicity theory*). De facto, a análise da estrutura da população fecal de *E. coli* poderá ser importante no estudo das doenças extraintestinais. Relativamente à cadela, a análise da flutuação da população de *E. coli* nas fezes ao longo do ciclo éstrico, no que se refere à prevalência e persistência de clones dominantes e a sua associação com os vários grupos filogenéticos, poderá gerar conhecimento de extrema importância na predisposição dessas cadelas a infecções do tracto urinário e piómetra.

Neste estudo procurou-se contribuir para o conhecimento da estrutura populacional de *E.coli* presente na microbiota fecal e vaginal de cadelas nas fases de estro e diestro do ciclo éstrico. Assim, este trabalho teve como objectivos específicos:

1. Caracterizar a prevalência dos diferentes grupos filogenéticos na população fecal e vaginal de *E. coli*;
2. Caracterizar a diversidade clonal na população fecal e vaginal de *E. coli*;
3. Determinar se clones de diferentes grupos filogenéticos representam populações dominantes ou minoritárias;
4. Avaliar a persistência de diferentes clones de *E. coli* na microbiota fecal e vaginal;
5. Avaliar o potencial preditivo da estrutura populacional de *E. coli* fecal/vaginal como factor predisponente para o desenvolvimento de piómetra.

Este trabalho foi realizado no âmbito de um projecto financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) (Projecto CIISA 6.2016).

1- Microbiota intestinal, um reservatório de *Escherichia coli* patogénica

No momento do nascimento dos mamíferos, o seu intestino não é colonizado por bactérias (Smith & Crabb, 1961). A partir do momento em que são alimentados, a colonização bacteriana instala-se de forma gradual e semelhante, essencialmente pelas mesmas bactérias dentro de cada espécie, e com posterior aumento ou diminuição quantitativa com a idade (Smith & Crabb, 1961). Contudo, uma vez que a alimentação de recém-nascidos é muito semelhante entre mamíferos, numa fase inicial a microbiota bacteriana fecal das diferentes espécies assemelha-se entre si (Smith & Crabb, 1961) sendo principalmente constituída por *Escherichia coli*, *Clostridium welchii* e *Streptococcus* (Davis, Cleven, Balish, & Yale, 1977; Smith & Crabb, 1961). Estudos demonstraram que, à medida que a idade avança, vai havendo uma redução gradual no número destas bactérias (Smith & Crabb, 1961). *Bacteroides* e *Lactobacillus* são dois géneros que aparecem mais tardiamente nas fezes destes animais mas muitas das vezes persistem em maior número por mais tempo (Smith & Crabb, 1961).

Escherichia coli é a bactéria mais frequentemente detectada na microbiota fecal de cães saudáveis, sendo também o agente bacteriano mais associado às infecções extra-intestinais (Bingen *et al.*, 1998).

De entre as várias classes de patotipos de *E. coli* destacam-se as estirpes de *E. coli* patogénicas extraintestinais (ExPEC) que, apesar de fazerem parte da microbiota fecal dos mamíferos, são responsáveis por causar doença fora do trato gastrointestinal (Bien, Sokolova, & Bozko, 2011; Köhler & Dobrindt, 2011; Russo & Johnson, 2000; Wiles, Kulesus, & Mulvey, 2008). As infecções extra-intestinais associadas a *E. coli* são comuns em todas as faixas etárias e podem acometer qualquer órgão ou local anatómico, podendo ser responsáveis por infecções urinárias, infecções uterinas, meningite e septicémia. As ExPEC incluem estirpes epidemiologicamente e filogeneticamente distintas das estirpes patogénicas intestinais, pertencendo na sua maioria ao grupo filogenético B2 (Picard *et al.*, 1999). No entanto, permanece ainda por esclarecer se as estirpes de *E. coli* que causam doença fora do intestino, como é o caso das infecções do tracto urinário, são o clone fecal/vaginal mais prevalente (prevalence theory) ou se existe uma sub-população de bactérias especializadas, que possuem um maior número de determinantes de virulência que lhe permite causar doença fora do intestino (special-pathogenicity theory) (Srivastava, Agarwal, Srivastava, & Mishra, 2014).

Vários estudos (Moreno *et al.*, 2009; Zhang, Foxman, & Marrs, 2002) mostraram que em mulheres saudáveis, no que se refere a *E. coli*, a microbiota intestinal é multiclonal com flutuações frequentes na sua composição. No entanto, os clones dos grupos filogenéticos

B2 e D parecem ser os mais dominantes, exibindo por isso também um maior número de factores de virulência. Esta informação é escassa na população de canídeos domésticos. No entanto, vários estudos mostram que as fezes de canídeos podem ser reservatórios de estirpes ExPEC para os humanos (Ahmed, Price, & Graham, 2015; Johnson, Stell, & Delavari, 2001; Nam, Eui-Hwa, Ko, Chae, & Hwang, 2013).

2- Microbiota vaginal

A vagina de cadelas saudáveis não é estéril, podendo haver um número variado de microrganismos que podem ser isolados (Kustritz, 2006). A população vaginal bacteriana muitas vezes é mista, composta por bactérias aeróbias e anaeróbias (Olson & Mather, 1978), frequentemente patogénicas oportunistas (Groppetti, Pecile, Barbero, & Martino, 2012).

A presença de bactérias é muitas vezes observada em esfregaços vaginais obtidos nas fases de pró-estro e estro (Groppetti *et al.*, 2012; Kustritz, 2006), e em menor número nas fases de diestro e anestro (Watts, Wright, & Whithear, 1996). As bactérias mais frequentemente isoladas a partir de amostras vaginais de cadelas saudáveis são *E. coli*, *Streptococcus canis*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Streptococcus* beta-hemolitica, *Streptococcus* alfa-hemolitica, *Bacillus* sp., *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus* sp. (Groppetti *et al.*, 2012; Kustritz, 2006). *Mycoplasma* e *Ureaplasma* também fazem parte da microbiota vaginal de cadelas saudáveis (Kustritz, 2006). De igual modo, a presença de bactérias no útero nas fases de pró-estro e estro não é necessariamente sinónimo de doença (Watts *et al.*, 1996). A contaminação uterina nestas fases do ciclo está associada ao facto do cérvix estar aberto permitindo a migração ascendente das bactérias. A carga bacteriana, os factores de virulência/fitness das bactérias, as alterações estruturais do endométrio e a diminuição da imunidade uterina no diestro são factores que contribuem para colonização e infecção do útero (Watts *et al.*, 1996).

3- *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria anaeróbia facultativa de Gram-negativo, pertencente à família das *Enterobacteriaceae* (Sousa, 2006), que faz parte da microbiota intestinal de humanos e animais (Russo & Johnson, 2000; Siqueira *et al.*, 2009; Sousa, 2006).

Com base em critérios genéticos e clínicos, as estirpes de *E. coli* dividem-se em três grandes grupos (Russo & Johnson, 2000): comensais, patogénicas intestinais e patogénicas extraintestinais. As estirpes consideradas comensais constituem a maior parte da microbiota

fecal facultativa na maioria dos mamíferos e aves (Russo & Johnson, 2000; Siqueira *et al.*, 2009). Esse grupo parece estar adaptado para coexistir pacificamente com o hospedeiro e outras bactérias e não parece causar doença no trato intestinal (Russo & Johnson, 2000; Sousa, 2006). Além disso, em humanos, geralmente não causam doenças fora do trato intestinal, excepto quando estão presentes factores precipitantes, como um corpo estranho residente ou diminuição das defesas do hospedeiro (Russo & Johnson, 2000). Os outros dois grupos são constituídos por estirpes patogénicas, que se dividem e são classificadas consoante o local onde provocam a doença: *E. coli* patogénica intestinal (*Intestinal pathogenic E. coli*, InPEC) e *E. coli* patogénica extraintestinal (*Extraintestinal pathogenic E. coli*, ExPEC) (Moriel, Rosini, Seib, Serino, *et al.*, 2012; Russo & Johnson, 2000). Em contraste com as estirpes comensais, as estirpes patogénicas intestinais de *E. coli* raramente são encontradas na microbiota fecal de hospedeiros saudáveis e, em vez disso, parecem ser agentes patogénicos essencialmente obrigatórios, causando gastroenterite ou colite quando presentes em número suficiente (Siqueira *et al.*, 2009; Sousa, 2006). Apesar da sua capacidade de causar doença entérica, estas estirpes são na sua maioria incapazes de causar doenças fora do trato intestinal (Russo & Johnson, 2000). As estirpes ExPEC estão na maioria das vezes associadas a meningites (Neonatal meningitis-associated *E. coli*, NMEC), sepsis (*Sepsis-associated E. coli*, SEPEC) e infecções do tracto urinário (*Uropathogenic E. coli*, UPEC) (Moriel *et al.*, 2012; Siqueira *et al.*, 2009). As UPEC têm características semelhantes às estirpes isoladas em casos de piómetra, o que se deve, provavelmente, ao facto de terem uma origem comum (Chen, Wright, Lee, & Browning, 2003; Mateus *et al.*, 2013). De uma maneira geral, as estirpes capazes de causar infecções extra-intestinais têm mais genes que codificam para determinantes de virulência do que as estirpes simbióticas (Baponi, Taravati, & Dilmagani, 2016; Mateus *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2002), pelo que são consideradas estirpes mais virulentas.

3.1. Factores de virulência

Os factores de virulência (FVs) conferem às bactérias a capacidade de colonizar, invadir e desenvolver doença no hospedeiro (Emödy, Kerényi, & Nagy, 2003; Kaper, Nataro, & Mobley, 2004). Estes factores estão codificados no genoma da bactéria, mas a sua expressão é regulada para que apenas sejam sintetizados quando e onde for necessário, evitando o gasto de energia desnecessário por parte da bactéria (Emödy *et al.*, 2003).

Os FVs intervêm em diferentes etapas da infecção, sendo estas: a adesão às células do hospedeiro, a colonização dos tecidos, multiplicação, invasão e destruição celular. Por esta razão, podem ser agrupados em diferentes classes de acordo com o seu papel na infecção. Destacam-se pela sua importância no estabelecimento e persistência da infecção, as adesinas/invasinas, o lipopolissacárido (LPS), os sistemas de aquisição de ferro

(sideróforos) e toxinas. A expressão dos vários FVs pelas bactérias determina a sua capacidade de originar determinada doença no hospedeiro (Bélanger *et al.*, 2011; Dobrindt & Hacker, 2008; Johnson *et al.*, 1991).

A adesão é um processo específico de reconhecimento entre a bactéria e as células do hospedeiro e é mediada por adesinas fimbriais ou afimbriais que se ligam a receptores na superfície das células do hospedeiro. Relativamente aos tipos de fimbrias, destacam-se, pela sua importância, as fimbrias tipo 1, as fimbrias P, fimbrias S e fimbrias F1C, sendo a adesão mediada pelas adesinas presentes na extremidade distal da fimbria, FimH, PapG, SfaS e FocH, respectivamente. Dentro dos vários tipos de fimbrias, as mais comuns são as fimbrias tipo 1, presentes em mais de 90 % das estirpes de *E. coli* (Blanco *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 2002), conferindo à bactéria a capacidade de colonizar diferentes ambientes, como por exemplo o intestino e a vagina (Johnson, 1991; Jones *et al.*, 1995).

Trabalhos anteriores da nossa equipa (Mateus *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014) e de outros autores (Chen *et al.*, 2003) mostraram que os genes *fimA* e *fimH*, do operão que codifica para as fimbrias tipo 1, estão presentes em 100 % dos isolados recolhidos de úteros de cadelas com piómetra.

A α -hemolisina e o factor citotóxico necrosante 1 (CNF1) são duas toxinas com um papel importante na virulência de estirpes de ExPEC (Emödy *et al.*, 2003; Goñi & Ostolaza, 1998). A α -hemolisina é uma toxina que pode levar à destruição de eritrócitos e células nucleadas do hospedeiro através da formação de poros, assim como interferir com vias de sinalização nas células do hospedeiro e causar apoptose (Johnson, 1991).

Vários estudos demonstraram que cerca de 50% das estirpes de *E. coli* isoladas de cadelas com piómetra têm no seu genoma o gene *hlyA*, que codifica para a toxina α -hemolisina (HlyA) (Chen *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014). Mais recentemente, o nosso grupo de investigação, demonstrou que a infecção uterina por *E. coli* β -hemolítica está mais frequentemente associada a metrite, com a consequente maior destruição do tecido uterino, quando comparado com a infecção por *E. coli* não hemolítica (Henriques *et al.*, 2014). O CNF1 poderá ter um papel na patogenia da piómetra, uma vez que o gene que codifica para esta toxina (*cnf1*) foi detectado nos isolados de *E. coli* associados a piómetra na mesma frequência (50%) que o gene *hlyA* (Mateus *et al.*, 2013, Henriques *et al.*, 2014). O CNF-1 é por definição uma toxina que activa de forma permanente as Rho, Rac e Cdc42 GTPases (Fabbri *et al.*, 2010). A activação de Rho pelo CNF-1 promove alterações na célula ao nível da organização e dinâmica do citoesqueleto de actina, bem como em outros processos celulares. Por outro lado, poderá também dar origem a células multinucleadas devido ao efeito inibitório na citocinese (Fabbri *et al.*, 2010). O LPS e os sistemas de captação de ferro são também exemplo de factores associados à virulência de *E. coli* e que permitem a colonização de diferentes ambientes. O LPS, ou endotoxina, é um componente da parede celular das bactérias de Gram-negativo, constituído por três subunidades: lípido

A, a porção central constituída por oligossacarídeos e o antígeno O. O lípido A é a porção responsável pela actividade de endotoxina do LPS. Para além de ser uma toxina, o LPS funciona também como potente indutor da resposta inflamatória (Raetz & Whitfield, 2002; Willis & Whitfield, 2013).

Por sua vez, os sistemas de captação de ferro são importantes FVs, essenciais ao estabelecimento da infecção, uma vez que estão envolvidos na tomada de ferro, um factor limitante à multiplicação bacteriana no hospedeiro. É comum encontrar no genoma de *E. coli* simultaneamente genes que codificam para diferentes sistemas de captação de ferro, tais como, sideróforos, moléculas com afinidade para o ferro que o remove das proteínas transportadoras; transportadores de metais (proteínas SitABCD); e o receptor ChuA (de ligação ao grupo heme) (Emödy *et al.*, 2003; Miethke & Marahiel, 2007). Este facto parece estar associado a uma optimização da tomada de ferro por *E. coli* em ambientes em que este elemento é um factor limitante (Emödy *et al.*, 2003), como por exemplo o útero. Por outro lado, a presença de genes que codificam para vários sistemas de aquisição de ferro no genoma de estirpes de *E. coli* de diferentes origens é ainda sugestivo de um mecanismo de redundância funcional, o que também confere uma vantagem na sobrevivência e persistência em diferentes ambientes (Subashchandrabose & Mobley, 2015).

3.2. Grupos filogenéticos

Análises filogenéticas demonstraram que as estirpes de *E. coli* podem ser divididas em quatro grupos filogenéticos principais: A, B1, B2 e D (Herzer, Inouye, Inouye, & Whittam, 1990). Em geral, as estirpes dos grupos filogenéticos B2 e D possuem um maior número de factores de virulência, quando comparado com as estirpes pertencentes aos grupos A e B1, conferindo-lhes por isso um maior potencial de virulência (Picard *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002). De facto, as estirpes associadas às infecções extra-intestinais estão incluídas maioritariamente no grupo B2 e possuem um maior número de factores de virulência (Johnson & Stell, 2000; Mateus *et al.*, 2013; Picard *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002). Na mulher, destacam-se as infecções do trato urinário (ITUs), com uma prevalência do GF B2 em 69% dos casos (Zhang *et al.*, 2002). Num estudo recente em cadelas, a prevalência do GF B2 foi de 47,8% e 93,5% em isolados de cistites e piómetra, respectivamente (Mateus *et al.*, 2013).

Embora muitos estudos tenham analisado amplamente a estrutura populacional de isolados patogénicos, pouca atenção foi dada à estrutura das populações comensais, mas sabe-se que, no homem, pertencem na sua maioria aos grupos filogenéticos A e B1 (Baponi *et al.*, 2016; Bingen *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002). Estudos anteriores demonstraram que o grupo filogenético B2 é menos prevalente entre os isolados de origem fecal, quando comparado com os obtidos de infecções extra-intestinais (Duriez *et al.*, 2001; Picard, Picard-

Pasquier, Krishnamoorthy, & Goullet, 1991). Por outro lado, as estirpes InPEC pertencem, na sua maioria, aos grupos filogenéticos A, B1 e D (Bingen *et al.*, 1998; Escobar-Páramo *et al.*, 2004; Russo & Johnson, 2000). Zhang *et al.* (2002) mostraram que havia variabilidade genética dentro de cada grupo filogenético, e que as estirpes B2 e D isoladas de casos de ITU eram geneticamente menos diversas do que as de origem rectal, dentro de cada indivíduo.

4. Métodos moleculares de tipagem bacteriana

A discriminação de isolados bacterianos dentro da mesma espécie é essencial para a prevenção e controlo de doenças, permitindo a identificação da fonte de infecção, de estirpes particularmente virulentas e a monitorização de programas de vacinação (Olive *et al.*, 1999). A elevada diversidade ao nível de espécie leva a que organismos isolados a partir de diferentes fontes, em alturas diferentes, e em diferentes regiões geográficas possam ser diferenciados ou classificados em subtipos ou estirpes. Actualmente, existem vários métodos de tipagem que permitem diferenciar clones. Por definição, isolados de uma mesma espécie bacteriana genotipicamente indistinguíveis, ou altamente semelhantes, são classificados como um clone, o que implica que descendam do mesmo ancestral recente (Spratt, 2004).

Os métodos de tipagem bacteriana mais usados são os métodos moleculares, também designados por métodos de genotipagem, que assentam na análise dos ácidos nucleicos (Olive & Bean, 1999). Os principais métodos de tipagem molecular podem ser subdivididos em dois grandes grupos: métodos baseados na técnica de PCR e métodos baseados na análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do ADN genómico (Olive & Bean, 1999). De entre os vários métodos baseados na técnica de PCR destacam-se a técnica de RAPD (*Randomly Amplified Polimorphic DNA Fingerprints*- análise do polimorfismo dos fragmentos de ADN amplificados aleatoriamente), Rep-PCR (que inclui a técnica REP-PCR, BOX-PCR e ERIC-PCR) e a técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*- Polimorfismos de tamanho dos Fragmentos Amplificados) (Jonas, Spitzmuller, Weist, Ruden, & Daschner, 2002; Olive & Bean, 1999). Nos métodos baseados na análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do ADN genómico incluem-se a técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*- electroforese em campo pulsado) e a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*- Análise do Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição do ADN genómico). Os vários métodos de tipagem molecular diferem no seu poder de discriminação, reprodutibilidade intra e inter-laboratorial, e custos associados (Tabela 1). Apesar de haver métodos que possam ter uma boa reprodutibilidade e um poder discriminatório alto, a complexidade do método e a interpretação dos resultados, bem como os custos associados na configuração e uso do método podem estar além das capacidades

do laboratório. Como tal, a escolha do método de tipagem molecular deverá ter em conta todos estes factores, e dependerá das necessidades, do nível de habilidade e dos recursos do laboratório (Olive & Bean, 1999).

Tabela 1- Caracterização dos diferentes métodos de tipagem de ADN

Metodologia	Facilidade de execução	Interpretação	Poder discriminatório	Resultado (dias)	R* intra-laboratorial	R* inter-laboratorial	Custo por análise
PFGE	Moderado	Fácil	Elevado	3	Boa	Boa	Moderado
PCR-RFLP locus-específico	Fácil	Fácil	Moderado	1	Boa	Boa	Baixo
Rep-PCR	Fácil	Fácil	Elevado	1	Boa	Moderada	Baixo
RAPD	Fácil	Fácil	Elevado	1	Moderado	Fraca	Baixo
CFLP	Moderado	Moderado	Moderado	2	Boa	Fraca	Alto
AFLP	Moderado	Fácil	Elevado	2	Boa	Boa	Moderado
Sequenciação	Difícil	Moderado	Elevado	2	Boa	Boa	Alto

Legenda: Tabela adaptada de Olive *et al.*, 1999; R*- Repetibilidade; PFGE- *Pulsed Field Gel Electrophoresis*; RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; Rep- Repetitive element sequence-based; RAPD- *Randomly Amplified Polimorphic DNA Fingerprints*; CFLP- *cleavase fragment length polymorphism*; AFLP- *Amplified Fragment Length Polymorphism*.

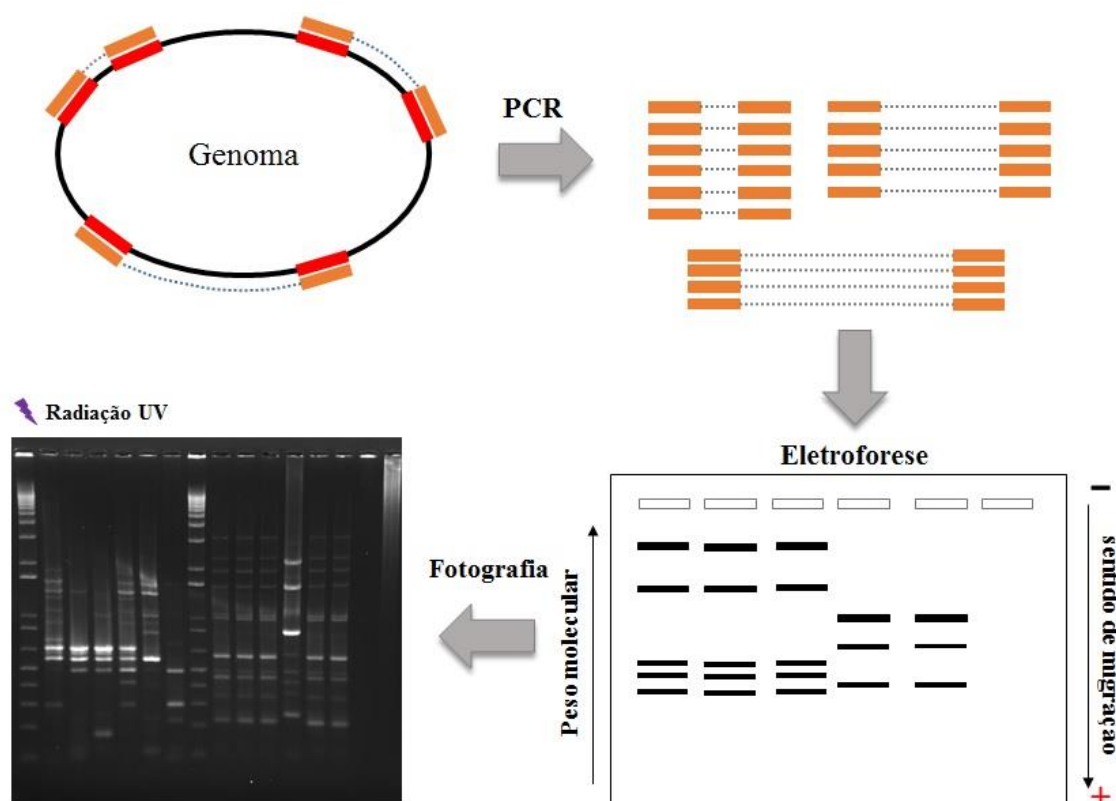
O PFGE foi considerado, durante muitos anos, o *gold standard* dos métodos de tipagem molecular, com um poder discriminatório superior às outras técnicas (Tabela 1) (Jonas *et al.*, 2002; Olive & Bean, 1999). No entanto, este método apresenta a desvantagem de serem necessários cerca de dois a três dias para efectuar esta análise e de ser um método dispendioso (Olive & Bean, 1999). Desta forma, é considerada um método pouco prático em análises com um grande número de isolados (Olive & Bean, 1999).

4.1. Rep-PCR

Este é um método a partir do qual se obtém a impressão digital de genomas bacterianos, através da análise de padrões específicos da estirpe obtidos a partir da amplificação por PCR de elementos repetitivos de ADN, presentes no genoma das bactérias (Imagem 1) (Versalovic, Koeuth, & Lupski, 1991). Há duas sequências de ADN utilizadas, a REP (*Repetitive Extragenic Palindromic elements*), e a ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements*) e o elemento BOX (Olive & Bean, 1999).

O Rep-PCR pode ser realizado com ADN extraído de colónias bacterianas ou por um método modificado usando células inteiras não processadas (Olive & Bean, 1999). A técnica de Rep-PCR tem um elevado poder discriminatório e uma boa reprodutibilidade sem que os custos associados sejam elevados (Olive & Bean, 1999).

Figura 1- Ilustração do método de Rep-PCR (original)



Esta técnica tem-se tornado muito utilizada na tipificação de ADN (Olive & Bean, 1999), e isto deve-se ao facto de esta ser de fácil execução, e poder ser aplicada a um grande número de isolados, podendo os custos envolvidos ser suportáveis em estudos com um grande número de isolados (Olive & Bean, 1999). Para além disso, apresenta uma boa correlação com os resultados do PFGE (Liu & Wu, 1997; Olive & Bean, 1999). Tendo em conta todos estes factores, esta foi a técnica seleccionada para a análise dos isolados deste estudo.

5. *E. coli* como bactéria responsável pelo desenvolvimento de piómetra

A piómetra é uma doença reprodutiva caracterizada pela infecção bacteriana e inflamação do útero com acumulação de pus (Hagman, 2012), causada em 90% dos casos por *E. coli* (Fransson, 2003; Mateus *et al.*, 2013).

Ocorre em cadelas inteiras, durante a fase de diestro, e normalmente em fêmeas com idade entre os 6 e os 9 anos (Hagman, 2012; Dow, 1958; Fukuda, 2001; Gibson, Dean, Yates & Stavisky, 2013; Johnston *et al.*, 2001; Niskanen & Thrusfield, 1998).

Durante as fases de pró-estro e estro, há dilatação do cérvix, que permite a entrada de bactérias no útero de cadelas saudáveis (Silva, Onclin, & Verstegen, 1995). Os isolados de *E. coli* encontrados nesta afecção são muito semelhantes aos envolvidos em situações de ITU, e isto deve-se ao facto de, muito provavelmente, serem infecções bacterianas provocadas pela microbiota fisiológica do intestino ou da vagina (Hagman & Kühn, 2002), que migram para o útero durante as fases éstricas acima citadas. As estirpes UPEC são mais comumente associadas a piómetra, e tal deve-se ao facto de, muito provavelmente, estes resistirem mais facilmente às defesas do hospedeiro e invadirem o útero de forma mais eficaz (Hagman *et al.*, 2002).

A fisiopatologia da piómetra não é totalmente conhecida. Ainda assim, foi demonstrado que úteros saudáveis em que se inoculou *E. coli*, durante a fase de estro, tiveram capacidade de eliminar esta bactéria, evidenciando que são necessários vários factores para a ocorrência desta doença (Arora, Sandford, Browning, Sandy, & Wright, 2006). São estes: alterações endometriais, influência hormonal no ambiente uterino, o tipo e a virulência da bactéria, e os mecanismos de defesa individual (Hagman, 2004; Mateus *et al.*, 2013).

Mateus *et al.* (2013) mostraram que os isolados de cadelas com piómetra eram principalmente do GF B2, tendo concluído que este grupo possui o maior potencial para colonizar o útero canino e estabelecer infecção. Descobriram também que os isolados de *E. coli* desta doença exibiam um elevado número de genes para os FVs e marcadores de Ilhas de Patogenicidade (PAI) (Mateus *et al.*, 2013). No entanto, esse perfil de virulência também foi encontrado em isolados obtidos de casos de cistite e de origem fecal, tendo por isso sugerido que os isolados obtidos em casos de cistite e pertencentes à microbiota fecal fossem capazes de induzir piómetra, indo de encontro a estudos anteriores (Hagman & Kühn, 2002; Mateus *et al.*, 2013).

MATERIAIS E MÉTODOS

6. Colheita das amostras

6.1 Cadelas

Trinta cadelas inteiras (n=30), de dezasseis raças distintas foram usadas para colheita de amostras de origem vaginal e fecal. As cadelas tinham idades compreendidas entre um e nove anos, com uma idade média de 3,6 anos. Dezanove cadelas cruzaram ou foram inseminadas no decorrer do nosso trabalho. A selecção das cadelas foi aleatória, tendo como único critério de exclusão a presença de doença.

6.2 Amostras de origem fecal e vaginal

Considerando que uma amostra corresponde a uma zaragatoa, foram colhidas 120 amostras de 30 cadelas diferentes. Todas as amostras foram colhidas com zaragatoas estéreis, tendo sido utilizadas duas por indivíduo (uma zaragatoa vaginal e uma fecal), e em duas fases do ciclo éstrico (estro e um mês depois, em diestro).

As duas fases éstricas foram determinadas com base no início do corrimento sanguíneo, na citologia vaginal feita no dia de cada colheita, e no doseamento de progesterona plasmática.

7. Caracterização das amostras

7.1. Isolamento e identificação de *E. coli*

Tanto as zaragatoas fecais como vaginais, momentos após a colheita, foram inoculadas num meio sólido: Agar MacConkey (MCK), selectivo para bactérias de Gram-negativo. Posteriormente, as placas foram a incubar a 37°C durante um período de 24 horas, após as quais se procedeu ao isolamento aleatório de dez colónias. A selecção das 10 colónias baseou-se na escolha das colónias lactose positivas, identificadas macroscopicamente através da presença da coloração rosa com um halo translúcido à sua volta. As colónias seleccionadas foram isoladas para meio Agar Columbia com 5% de sangue de cordeiro (COS). Após a passagem para COS, e passadas mais 24 horas de incubação a 37°C, fez-se a caracterização fenotípica das colónias. Depois disso, confirmou-se a pureza da cultura, e realizou-se a coloração diferencial de Gram (para confirmação de estarmos perante bacilos de Gram-negativo). Após esta confirmação, foi feito o teste de oxidase (Bactident Oxidase, 1.13300.0001, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), para o qual *E. coli* tem resultado negativo, tendo-se assim chegado à identificação presuntiva das culturas como pertencentes à espécie *E. coli*.

Para além da identificação descrita, foi confirmado para todos os isolados um PCR para o gene 16S do ARN ribossomal (ARNr) de *E. coli*, cujos resultados vieram corroborar a identificação presuntiva realizada anteriormente. Esta técnica foi realizada utilizando as seguintes condições no ciclo: dois minutos a 94°C, 30 ciclos com um ciclo de um minuto a 94°C, um ciclo de um minuto a 55°C e um ciclo de um minuto a 72°C, terminando com uma extensão final de cinco minutos a 72°C.

Todos os isolados foram conservados à temperatura de -80°C, em criotubos com caldo BHI e 30% de glicerol.

7.2. Avaliação do fenótipo

A análise do fenótipo (mucóide/não mucóide; hemolítico/não hemolítico) foi feita com base na observação macroscópica das colónias em placas COS, após 24 horas de incubação a 37°C. O fenótipo mucóide/não mucóide foi avaliado através da observação macroscópica do aspecto mucóide das colónias crescidas nas placas de COS.

A actividade hemolítica associada à expressão da α -hemolisina foi avaliada pela formação de um halo de hemólise clara à volta das colónias crescidas nas placas de COS.

8.Extracção de ADN e técnicas de PCR

8.1. Extracção de ADN

A partir de uma técnica rápida de fervura, foi possível fazer-se a extracção de ADN total, tendo sido obtido como produto final tanto o ADN cromossómico como o plasmídico. Para tal, procedeu-se à propagação dos isolados para COS, armazenados a -80°C, que incubaram durante a noite a 37°C. No segundo dia, através da repicagem de uma só colónia proveniente do meio COS, foi feita a incubação em 5 ml de meio líquido Luria-Bertani (LB) e colocadas no incubador com agitação orbital durante a noite, a uma velocidade de 180 rpm a 37°C. Passado o tempo descrito, procedeu-se à extracção propriamente dita. Centrifugaram-se 3 ml do inóculo a 13.000 rpm, durante 8 minutos, ressuspendeu-se o sedimento em 500 μ L de água desionizada estéril e realizou-se uma nova centrifugação (13.000 rpm, 3 min), após a qual se fez ressuspensão em 100 μ L de água desionizada estéril. De seguida, fez-se incubação a 100°C durante 15 minutos, seguida de uma última centrifugação (13.000 rpm, 8 min), e recolheu-se o sobrenadante, que foi armazenado a -20°C.

8.2. Estirpes de referência utilizadas nas técnicas de PCR

Para o PCR realizado com o intuito de confirmar a presença de estirpes de *E. coli* (para o gene 16s), foi usada como controlo positivo a estirpe de referência *E. coli* J96.

As estirpes *E. coli* J96 (positiva para os genes *gadA*, *chuA*, *yjaA* e o fragmento de ADN TSPE4.C2) e *E. coli* KS52 (positiva para os genes *gadA* e *yjaA*) foram usadas como controlo positivo nas reacções de PCR para determinação do grupo filogenético.

8.3. Identificação do grupo filogenético por Multiplex PCR

A determinação do GF foi feita com base num estudo descrito anteriormente (Doumith, Day, Hope, Wain, & Woodford, 2012) recorrendo à técnica de PCR-multiplex para os genes *gadA*, *chuA* e *yjaA*, e para o fragmento de ADN TSPE4-C2. Através deste processo foi possível determinarem-se os quatro GFs conhecidos: A, B1, B2 e D.

A amplificação por PCR de ADN de isolados bacterianos foi efectuada com base em estudos anteriores (Clermont, Bonacorsi, & Bingen, 2000), com optimizações feitas por Doumith *et al.* (2012).

Tabela 2- Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para determinação do GF

Marcador	Sequência de oligonucleótidos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto (pb)
<i>gadA</i>	Forward GATGAAATGGCGTTGGCGCAA Reverse GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC	373
<i>chuA</i>	Forward ATGATCATCGCGGCGTGCTG Reverse AAACGCGCTCGCGCCTAAT	281
<i>yjaA</i>	Forward TGTTGCGGATCTTGAAAGCAAACGT Reverse ACCTGTGACAAACCGCCCTCA	216
TSPE4.C2	Forward GCGGGTGAGACAGAAACGCG Reverse TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG	158

8.4 Tipificação genómica por Rep-PCR

A técnica de *Repetitive sequence-based* PCR (Rep-PCR) foi a usada para tipagem do ADN genómico e diferenciação dos isolados de *E. coli*, segundo as condições utilizadas em estudos anteriores (Silva *et al.*, 2009). Usando um termociclador (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), a reacção de PCR iniciou-se com um ciclo de desnaturação (95°C, 7 min), seguido de 30 ciclos de desnaturação (90°C, 30 s), hibridação (40°C, 1 min) e extensão (72°C, 8 min), e um ciclo final de extensão (72°C, 16 min). Em todas as reacções de PCR realizadas foi usado como controlo negativo uma amostra proveniente da mesma mix, à qual foi adicionado H₂O em substituição do ADN.

Após o término da reacção, 20 µL do produto de PCR foram corridos em gel de agarose (CFL-LMA 100, Low Melting Agarose (Cleaver Scientific Ltd)) 1% em tampão TAE 1x, durante cerca de 4 h 30 min a 50 Volts. Posteriormente os géis foram corados com brometo de etídio 1% (5 µl/100 ml), fotografados sob trans-iluminação UV (ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software). Através da utilização do marcador *DNA Ladder* VI 1kb Plus *DNA Ladder* (Invitrogen) foi possível proceder-se à determinação do peso molecular das bandas presentes em cada amostra.

Os perfis de Rep-PCR gerados foram analisados através do *software* BioNumerics (versão 6.6, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Os dendrogramas de similaridade dos isolados foram construídos usando o coeficiente de correlação de *Pearson* pelo método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (*UPGMA: Unweighted Pair Groups using Arithmetic averages*). Tendo em conta a reprodutibilidade da técnica de Rep-PCR de 88,9%, avaliada para 10% dos isolados em análise, os isolados de *E. coli* com uma similaridade no perfil do Rep-PCR superior ou igual a 88,9% foram considerados representativos do mesmo clone. O clone mais abundante em cada amostra foi definido como clone dominante. Na análise individual das fases do ciclo (estro vs diestro) e dos locais de colheita (vaginal vs fecal), consideraram-se amostras pauciclonaes as que eram constituídas por um ou dois clones distintos, e amostras multiclonais as constituídas por três ou mais clones. Quando a análise foi feita por animal (duas fases + dois locais de colheita), considerou-se amostras pauciclonaes as que eram constituídas por quatro ou menos clones distintos, e amostras multiclonais as constituídas por cinco ou mais clones diferentes (Moreno *et al.*, 2009).

9. Análise estatística

As comparações de proporções foram testadas usando o teste exacto de *Fisher* (Statistica 5.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA, 1995). O nível de significância escolhido foi de 5% ($p < 0,05$). A comparação entre proporções foi feita com base no teste Z e os intervalos de confiança usados para as proporções foram calculadas segundo o método de Wilson (Rothman, 2002).

De modo a levar em conta a não independência dos vários isolados no mesmo animal, foi utilizado um modelo de regressão misto para avaliar a associação entre a presença de um clone em fases e locais de colheita diferentes. Nestes modelos, a cadela foi incluída como factor aleatório e a fase do ciclo éstrico, local de colheita e o grupo filogenético como factores fixos.

RESULTADOS

Numa primeira abordagem, e por forma a facilitar a compreensão dos resultados, estes serão apresentados por fase do ciclo éstrico e local de colheita. Numa segunda abordagem, os resultados foram agrupados e analisados por cadela, por forma a avaliar possíveis relações entre a presença de um determinado clone nas duas fases do ciclo éstrico e nos dois locais de colheita.

1. CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* OBTIDOS NA FASE DE ESTRO

1.1 Isolados de *E. coli* de origem fecal

Das 30 zaragatoas fecais obtidas de 30 cadelas diferentes, obtiveram-se um total de 285 isolados de *E. coli*. A distribuição destes isolados pelos animais em estudo encontra-se representada na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos isolados de *E. coli* de origem fecal em estro

Nº de isolados de <i>E. coli</i> /cadela	Nº de cadelas	Nº total de isolados
≤ 5	0	0
6	2	12
7	1	7
8	1	8
9	2	18
10	24	240
Total	30	285

1.1.1. Caracterização fenotípica dos isolados

Através da análise das placas onde ocorreu a multiplicação bacteriana, foi possível caracterizar fenotipicamente as colónias e concluir que na sua maioria (65%) se tratavam de bactérias com fenótipo não mucóide e não hemolítico (n=188). Em menor número, isolaram-se também bactérias de fenótipo não mucóide e hemolítico (n=95), e mucóide e não hemolítico (n=2).

1.1.2. Prevalência dos grupos filogenéticos e sua associação com o fenótipo

Tendo em conta os produtos de PCR obtidos na reacção de multiplex para determinação dos GFs, os isolados foram distribuídos pelos quatro GFs, por ordem decrescente de prevalência, da seguinte forma: B2 (50%), A (24%), B1 (17%) e D (9%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição do número de isolados dos diferentes GFs por cadela, de origem fecal em estro

Grupos filogenéticos	% Cadelas (N=30)	% isolados (N=285)
A	46,67	24,21
	(n=14)	(n=69)
B1	46,67	17,19
	(n=14)	(n=49)
B2	70,00	49,83
	(n=21)	(n=142)
D	23,33	8,77
	(n=7)	(n=25)

Esta análise demonstrou ainda que das 30 cadelas analisadas, 15 apresentaram isolados pertencentes a apenas um GF, seis tinham isolados de duas filogenias diferentes, sete de três filogenias e duas cadelas apresentaram isolados dos quatro GFs. Todos os isolados pertencentes aos GFs B1 e D apresentam fenótipo não mucóide e não hemolítico. Por outro lado, os isolados do grupo B2 subdividem-se em dois fenótipos diferentes, embora pertençam maioritariamente ao fenótipo não mucóide e hemolítico (n=95) (67%; $p < 0,0001$). Os isolados de filogenia A são maioritariamente não mucóides e não hemolíticas (n=67), e em menor número mucóides e não hemolíticas (n=2).

1.1.3. Identificação de clones e associação com os grupos filogenéticos

Dos 285 isolados, foram identificados 103 clones diferentes, com uma média de 3,4 clones por amostra (limite 1 - 9 clones). Aproximadamente 40% da população apresentou apenas um clone de uma só filogenia, dos quais 83% pertencem à filogenia B2 ($p < 0,01$) e os restantes 17% à filogenia A (Tabela 5). Cerca de 13% da amostragem apresentou dois clones, cada um deles representado por uma filogenia distinta. As restantes cadelas (n=14) tinham vários clones pertencentes à mesma filogenia ou de GFs distintos.

Tabela 5- Distribuição dos 103 clones de *E. coli* de origem fecal entre as 30 cadelas em estro

	Identificação do animal	Clones										
Pauciclinal	5	A (10)										
	13	A (10)										
	1	B2 (10)										
	4	B2 (10)										
	7	B2 (10)										
	12	B2 (10)										
	39	B2 (10)										
	40	B2 (9)										
	42	B2 (10)										
	46	B2 (10)										
	51	B2 (10)										
	66	B2 (10)										
	2	A (9)	B1(1)									
Multiclinal	11	B1 (7)	B2 (3)									
	52	B1 (9)	B2 (1)									
	43	B1 (1)	B2 (5)									
	9	B2 (7)	B2 (2)	B2 (1)								
	20	A (6)	B1 (2)	B1 (2)								
	44	A (5)	B2 (4)	B2 (1)								
	25	D (4)	D (3)	D (2)	D (1)							
	6	A (3)	B1 (2)	B1 (1)	B2 (1)	D (2)	D (1)					
	10	A (5)	A (1)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (1)	D (1)					
	21	A (2)	A (1)	A (1)	A (1)	B1 (1)	B2 (1)					
	47	A (1)	B1 (1)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)					
	49	A (1)	A (1)	B1 (3)	B1 (1)	B1 (1)	D (1)					
	8	B2 (2)	B2 (2)	B2 (2)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)				
	61	A (2)	B1 (2)	B1 (2)	D (1)	D (1)	D (1)	D (1)				
	17	A (3)	A (1)	A (1)	B1 (1)	D (1)	D (1)	D (1)	D (1)			
	33	A (1)	A (1)	B1 (2)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (1)	B2 (1)		
	34	A (1)	A (1)	A (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	D (1)	D (1)		

Legenda- Cada cadela está representada por uma linha de caixas (clones). Em cada caixa encontra-se a indicação do GF (assinalados a diferentes cores) e o número de isolados do respectivo clone.

Contrariamente aos restantes GF, a filogenia B2 teve uma distribuição igual entre clones de fenótipo não mucóide e hemolítico e não mucóide e não hemolítico (Tabela 6).

Tabela 6- Distribuição do número de clones por fenótipo e filogenia

	Nº cadelas	Nº clones M + NH	Nº clones NM + H	Nº clones NM + NH
A (N=24)	14	2	0	22
B1 (N=27)	13	0	0	27
B2 (N=34)	21	0	17	17
D (N=18)	7	0	0	18

Legenda: A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos; M- mucóide; NM- não mucóide; H- Hemolítico; NH- não hemolítico; N- número total de clones

1.1.4 Identificação dos clones dominantes

Neste estudo foram identificados 26 clones dominantes. Em quatro fêmeas não foi identificado nenhum isolado como clone dominante pelo facto de terem 2 ou mais clones com o mesmo número de isolados, pelo que nenhum obteve dominância sobre os restantes. A prevalência de cada GF entre os 20 clones dominantes e os 77 não dominantes está representada na Tabela 7. Em associação, os GFs B2 e A estão representados em maior proporção nos clones dominantes (80,8%) do que nos clones não dominantes (48%: $p < 0,01$).

Tabela 7- Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs

Grupos Filogenéticos	% clones dominantes (N=26)	% clones não dominantes (N=77)
A	34,6 (n=9)	19,4 (n=15)
B1	15,4 (n=4)	29,9 (n=23)
B2	46,2 (n=12)	28,6 (n=22)
D	3,8 (n=1)	22,1 (n=17)

Legenda: A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos; N- número total de clones dominantes/não dominantes

1.1.5 Identificação e caracterização de amostras pauciclonaes e multiclonais

Um total de 16 amostras de origem fecal foi caracterizado como pauciclonaes, com um total de 20 clones. As restantes 14 amostras foram classificadas como multiclonais, com um total de 83 clones. Clones do GF B2 foram significativamente mais prevalentes entre amostras pauciclonaes do que multiclonais (65% vs. 25%, respectivamente, $p < 0,01$). Contrariamente, os clones do grupo D foram significativamente associados a amostras multiclonais (22% vs. 0% de amostras pauciclonaes, $p < 0,05$). Os clones dos GFs A e B1 foram associados de forma semelhante a amostras pauciclonaes e multiclonais (GF A: 15% vs. 25%, respectivamente, $p = \text{NS}$; GF B1: 20% vs. 28%, respectivamente, $p = \text{NS}$).

1.2. Isolados de *E.coli* de origem vaginal

Apenas 11 das 30 zaragatoas vaginais colhidas nas fêmeas em estro foram positivas para o crescimento de *E.coli*, tendo sido obtidos um total de 99 isolados (Tabela 8).

Tabela 8- Número de isolados de *E.coli* de origem vaginal de cadelas em estro

Nº de isolados de <i>E. coli</i> /cadela	Nº de cadelas	Total de isolados
≤ 3	0	0
4	1	4
5	0	0
6	0	0
7	1	7
8	1	8
9	0	0
10	8	80
Total	11	99

1.2.1. Caracterização fenotípica dos isolados

Os isolados obtidos apresentaram fenótipo não mucóide, com uma prevalência de isolados hemolíticos semelhante aos não hemolíticos ($p > 0,05$).

1.2.2. Prevalência dos grupos filogenéticos e sua associação com o fenótipo

Dos 99 isolados testados, concluiu-se que a maioria das amostras pertencia ao grupo B2 (Tabela 9). Nenhum isolado foi caracterizado como pertencente ao grupo A. À semelhança do que se verificou nos isolados de origem fecal, os isolados pertencentes aos GFs B1 e D apresentaram todos fenótipo não mucóide e não hemolítico ($n=11$ e $n=16$, respectivamente). O GF B2 é na sua maioria constituído por isolados com fenótipo não mucóide e hemolítico ($n=44$) (61%; $p < 0,01$).

Tabela 9 – Distribuição do número de isolados dos diferentes GFs por cadela, de origem vaginal em estro

Grupos filogenéticos	% Cadelas (N=11)	% isolados (N=99)
A	0 (n=0)	0 (n=0)
B1	18,2 (n=2)	11,11 ^b (n=11)
B2	81,8 (n=9)	72,73 ^a (n=72)
D	18,2 (n=2)	16,16 ^b (n=16)

Legenda: A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos. ^{a, b} - p < 0,05 (fisher test).

1.2.3. Identificação dos clones e associação com os grupos filogenéticos

Dos 99 isolados, foram identificados 16 clones distintos, com uma média de 1,5 clones por amostra (limite 1-3 clones). Nove fêmeas (82%) apresentaram isolados vaginais apenas de um GF (D ou B2), tendo sido o grupo B2 o mais prevalente ($p < 0,01$) (Tabela 10). Nas outras duas cadelas (18%) os isolados estavam distribuídos por dois GFs distintos (B1 e D, ou B1 e B2). Em nenhum dos animais houve isolamento simultâneo de isolados de *E. coli* pertencente a três ou quatro GFs distintos. Em cerca de 64% ($n=7$) das amostras os isolados eram só de um clone, 86% dos quais do grupo B2 ($p < 0,05$). As restantes 36% tinham dois ou três clones.

Tabela 10- Distribuição dos 16 clones de *E. coli* de origem vaginal entre as 11 cadelas em estro

Identificação do animal		Clones		
Pauciclona	49	B2 (6)		
	33	B2 (4)		
	43	B2 (10)		
	7	B2 (7)		
	11	B2 (10)		
	66	B2 (10)		
	17	D (10)		
Multiclona	8	B2 (8)	B2 (2)	
	51	B2 (8)	B2 (2)	
	6	B1 (4)	D (6)	
	47	B1 (5)	B1 (2)	B2 (1)

Legenda: cada cadela está representada por uma linha de caixas (clones). Em cada caixa encontra-se a indicação do GF (assinalados a diferentes cores) e número de isolados do respectivo clone.

A análise dos dados permitiu concluir que os clones dos GFs B1 e D tinham fenótipo não mucóide e não hemolítico (Tabela 11). O GF B2 dividiu-se em 11 clones distintos, sete de fenótipo não mucóide e hemolítico, e quatro clones não mucóides e não hemolíticos ($p > 0,05$).

Tabela 11- Representação do número de clones de cada filogenia e fenótipo, por cadela.

Nº clones/GF	Nº cadelas	Nº clones M + NH	Nº clones NM + H	Nº clones NM + NH
A (N=0)	0	0	0	0
B1 (N=3)	2	0	0	3
B2 (N=11)	9	0	7	4
D (N=2)	2	0	0	2

Legenda: M- mucóide, NM- não mucóide, H- hemolítico, NH- não hemolítico. A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos. N- número total de clones.

1.2.4. Identificação dos clones dominantes

Foram identificados 16 clones, dos quais 11 demonstraram ser dominantes e cinco não dominantes (Tabela 12). Relativamente aos clones dominantes, o GF B2 mostrou ser mais prevalente ($p < 0,05$). A prevalência de cada GF entre os 11 clones dominantes e os cinco não dominantes está representada na Tabela 12.

Em associação, os GFs B2 e D estão representados em maior proporção nos clones dominantes (90,9%) do que nos clones não dominantes (60%: $p < 0,05$).

Tabela 12- Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs

Grupos Filogenéticos	% clones dominantes (N=11)	% clones não dominantes (N=5)
A	0 (n=0)	0 (n=0)
B1	9,1 (n=1)	40 (n=2)
B2	72,7 (n=8)	60 (n=3)
D	18,2 (n=2)	0 (n=0)

Legenda: A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos

1.2.5. Identificação e caracterização de amostras pauciclonaes e multiclonaes

Esta análise permitiu identificar 10 amostras pauciclonaes, com um total de 13 clones, e uma multiclonal, com um total de três clones (Tabela 10).

Entre os 13 clones pertencentes a amostras pauciclonaes, 10 eram do GF B2 ($p < 0,05$). Relativamente aos três clones da amostra multiclonal, apenas um pertencia ao GF B2. Os clones do grupo D foram exclusivamente associados a amostras pauciclonaes (20% vs. 0% de amostras multiclonaes). O GF B1 foi associado a uma amostra pauciclonal e a uma multiclonal.

2. CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* OBTIDOS NA FASE DE DIESTRO

2.1. Isolados de *E. coli* de origem fecal

Para este estudo foram analisadas amostras de 30 cadelas, das quais foram isolados um total de 296 isolados. Na Tabela 13 está representada a distribuição destes isolados pelas cadelas.

Tabela 13- Número de isolados de *E. coli* de origem fecal em diestro

Nº de isolados de <i>E. coli</i> /cadela	Nº de cadelas	Total de isolados
≤6	0	0
7	1	7
8	0	0
9	1	9
10	28	280
Total	30	296

2.1.1. Caracterização fenotípica dos isolados

Verificou-se que o número de isolados com fenótipo não mucóide e não hemolítico foi o mais prevalente (n=216) (73%; p< 0,0001).

2.1.2. Prevalência dos grupos filogenéticos e sua associação com o fenótipo

Os quatro grupos foram distribuídos, por ordem decrescente de prevalência, da seguinte forma: B2 (47%), A (29%), B1 (20%) e D (5%) (Tabela 14).

Contrariamente aos restantes GF, o GF B2 apresenta igual distribuição entre o fenótipo não mucóide e hemolítico (n=68) e não mucóide e não hemolítico (n=68).

Das 30 cadelas analisadas, 15 apresentaram isolados pertencentes a apenas um GF, sete tinham isolados de duas filogenias diferentes, seis tinham de três filogenias e duas apresentaram isolados dos quatro GFs.

Tabela 14- Distribuição do número de isolados dos diferentes GFs por cadela, de origem fecal em diestro

Grupos filogenéticos	% Cadelas (N=30)	% isolados (N=296)
A	46,67	28,72 ^a
	(n=14)	(n=85)
B1	40,00	19,59 ^b
	(n=12)	(n=58)
B2	70	46,96^c
	(n=21)	(n=139)
D	26,67	4,73 ^d
	(n=8)	(n=14)

Legenda: M- mucóide, NM- não mucóide, H- hemolítico, NH- não hemolítico. A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos; ^{a, b} p <0,05; ^{a, c} p <0,0001; ^{b, c} p <0,001; ^{a, d; b, d; c, d} p <0,0001.

2.1.3. Identificação dos clones e associação com os grupos filogenéticos

Relativamente à análise clonal (Tabela 15), dos 296 isolados foram identificados 99 clones diferentes, com uma média de 3,2 clones por amostra (limite 1-7). Aproximadamente 27% da população apresentou apenas um clone, dos quais 62,5% (p=NS) pertencem ao GF B2. Cerca de 23% (n=7) das cadelas apresentou dois a sete clones embora pertencentes à mesma filogenia, dentro de cada amostra. No entanto, neste último caso prevalece a filogenia B2 (85,7% das amostras; p <0,05). As restantes cadelas (cerca de 50%) apresentaram vários clones pertencentes a várias filogenias.

Tabela 15- Distribuição dos 99 clones de *E. coli* de origem fecal entre as 30 cadelas em diestro

Identificação do animal		Clones							
Pauciclona	8	A (10)							
	2	B1 (10)							
	39	B1 (10)							
	1	B2 (10)							
	4	B2 (10)							
	11	B2 (10)							
	13	B2 (10)							
	40	B2 (10)							
	12	B2 (6)	B2 (4)						
	52	B2 (9)	B2 (1)						
	5	A (9)	B2 (1)						
	9	B2 (7)	B2 (2)	B2 (1)					
Multiclona	25	B2 (5)	B2 (3)	B2 (2)					
	46	B2 (8)	B2 (1)	B2 (1)					
	7	A (3)	A (2)	B2 (5)					
	20	A (4)	A (2)	B2 (1)					
	66	A (1)	B2 (6)	B2 (2)					
	10	A (5)	A (2)	B2 (1)	D (2)				
	17	A (6)	A (2)	B1 (1)	D (1)				
	47	A (5)	A (1)	A (1)	D (3)				
	49	A (5)	B1 (3)	B1 (1)	B1 (1)				
	34	A (4)	A (1)	B1 (3)	B1 (1)	D (1)			
	42	B1 (3)	B2 (3)	B2 (1)	D (2)	D (1)			
	43	B1 (3)	B1 (1)	B2 (4)	B2 (1)	B2 (1)			
	44	B2 (5)	B2 (2)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)			
	61	A (6)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (1)			
	21	A (3)	A (2)	B1 (2)	B1 (1)	B2 (1)	D (1)		
	33	A (4)	B1 (2)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (1)	D (1)		
	6	A (3)	A (1)	A (1)	A (1)	A (1)	B1 (1)	D (2)	
	51	B1 (4)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	

Legenda- Cada cadela está representada por uma linha de caixas (clones). Em cada caixa encontra-se a indicação do GF (assinalados a diferentes cores) e número de isolados do respectivo clone.

Contrariamente aos restantes GF, o GF B2 teve uma distribuição semelhante entre clones de fenótipo não mucóide e hemolítico e não mucóide e não hemolítico (Tabela 16).

Tabela 16- Distribuição do número de clones por fenótipo e filogenia

	Nº cadelas	Nº clones M + NH	Nº clones NM + H	Nº clones NM + NH
A (N=26)	14	2	0	24
B1 (N=27)	12	0	0	27
B2 (N=37)	21	1	15	21
D (N=9)	8	1	0	8

Legenda: M- mucóide, NM- não mucóide, H- hemolítico, NH- não hemolítico. A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos; N- número total de clones.

2.1.4. Identificação de clones dominantes

Um total de 29 clones dominantes foi identificado nesta fase do ciclo (Tabela 17). Os GFs B2 e A tiveram uma prevalência semelhante nos clones dominantes (48% e 41%, respectivamente). No entanto, em associação, os GFs B2 e A estão representados em maior proporção nos clones dominantes (89,7%) do que nos clones não dominantes (52,9%: $p < 0,001$).

Tabela 17- Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs

Grupos Filogenéticos	% clones dominantes (N=29)	% clones não dominantes (N=70)
A	41,4 (n=12)	20,0 (n=14)
B1	10,3 (n=3)	34,3 (n=24)
B2	48,3 (n=14)	32,9 (n=23)
D	0 (n=0)	12,9 (n=9)

Legenda: A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos.

2.1.5 Identificação de amostras pauciclonaes e multiclonais

Um total de 11 amostras de origem fecal foi caracterizado como pauciclonaal, com um total de 14 clones (Tabela 15). As restantes 19 amostras foram classificadas como multiclonais, com um total de 85 clones. Clones do GF B2 foram igualmente distribuídos entre amostras pauciclonaes e multiclonais (73% vs. 68%, respectivamente). Contrariamente, os grupos A e D foram significativamente associados a amostras multiclonais (GF A: 63% vs. 18% de pauciclonaes, $p < 0,05$; GF D: 42% vs. 0% de amostras pauciclonaes, $p < 0,05$). O GF B1 foi mais associado a amostras multiclonais, sem diferença significativa (53% vs. 18% de amostras pauciclonaes, $p = \text{NS}$).

2.2. Isolados de *E. coli* de origem vaginal

Houve crescimento em placa e isolamento de *E. coli* a partir de 10 zaragatoas vaginais (Tabela 18). Relativamente ao número de cadelas das quais foi possível isolar a bactéria, oito mantiveram o crescimento da mesma em diestro, enquanto três fêmeas deixaram de ter a bactéria, e duas não tinham em estro e passaram a ter em diestro.

Tabela 18- Número de isolados de *E.coli* de origem vaginal em diestro

Nº de isolados de <i>E. coli</i> /cadela	Nº de cadelas	Total de isolados
≤3	0	0
4	1	4
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	1	8
9	0	0
10	8	80
Total	10	92

2.2.1 Caracterização fenotípica dos isolados

O fenótipo não mucóide e hemolítico foi o mais prevalente (n=55) (60%; $p < 0,01$), seguido do fenótipo não mucóide e não hemolítico (n=33).

2.2.2 Prevalência dos grupos filogenéticos e sua associação com o fenótipo

As quatro filogenias foram distribuídas, por ordem decrescente de prevalência, da seguinte forma: B2 (86%), A (12%), B1 (2%) (Tabela 19). Todas as cadelas nas quais houve crescimento bacteriano nesta fase tinham isolados pertencentes ao GF B2. De oito das dez cadelas, fez-se o isolamento da bactéria pertencente unicamente ao GF B2 (Tabela 20), enquanto num outro indivíduo os isolados pertenciam a dois GFs distintos, A e B2, e de um outro elemento pertenciam a três GFs, A, B1 e B2. Nenhum dos isolados foi caracterizado como pertencente à filogenia D. Nenhuma cadela apresentou isolados dos quatro GFs. Todos os isolados pertencentes aos GFs A e B1 apresentaram fenótipo não mucóide e não hemolítico. Por outro lado, os isolados do grupo B2 subdividem-se em três fenótipos diferentes, embora pertençam maioritariamente ao fenótipo não mucóide e hemolítico (70%; $p < 0,0001$).

Tabela 19- Distribuição do número de isolados dos diferentes GFs por cadela, de origem vaginal em diestro

Grupos filogenéticos	% Cadelas (N=10)	% isolados (N=92)
A	20,0 (n=2)	11,96 ^b (n=11)
B1	10,1 (n=1)	2,17 ^c (n=2)
B2	100 (n=10)	85,87 ^a (n=79)
D	0 (n=0)	0 ^c (n=0)

Legenda: GF- grupos filogenéticos; ^{a, b} p< 0,001; ^{b, c} p< 0,05.

2.2.3 Identificação dos clones e associação com os grupos filogenéticos

Dos 92 isolados, foram identificados 18 clones diferentes, com uma média de 1,8 clones por amostra (limite 1 – 6 clones). 80% das amostras tinham *E. coli* pertencente unicamente ao GF B2 (p <0,05), com um ou dois clones cada (Tabela 20). Uma cadela (10%) expressou a bactéria pertencente a dois GFs, A e B2, sendo ambos constituídos por um só clone. Um outro indivíduo (10%) tinha a bactéria pertencente a três filogenias distintas, A, B1 e B2, cada uma delas contendo 2 clones distintos.

Tabela 20- Distribuição dos 18 clones de *E. coli* de origem vaginal entre as 10 cadelas em diestro

	Identificação do animal	Clones					
Pauciclona	7	B2 (4)					
	11	B2 (10)					
	43	B2 (10)					
	49	B2 (10)					
	51	B2 (10)					
	66	B2 (10)					
	8	B2 (5)	B2 (3)				
Multiclona	61	B2 (9)	B2 (1)				
	33	A (7)	B2 (3)				
	21	A (2)	A (2)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (2)	B2 (2)

Legenda: Cada cadela está representada por uma linha de caixas (clones). Em cada caixa encontra-se a indicação do GF (assinalados a diferentes cores) e o número de isolados do respectivo clone.

Relativamente ao GF B2, houve prevalência de clones pertencentes ao fenótipo não mucóide e hemolítico, comparativamente com o fenótipo não mucóide e não hemolítico ($p < 0,01$) (Tabela 21).

Tabela 21-Distribuição do número de clones por fenótipo e filogenia

	Nº cadelas	Nº clones M + NH	Nº clones NM + H	Nº clones NM + NH
A (N=3)	2	0	0	3
B1 (N=2)	1	0	0	2
B2 (N=13)	10	0	10	3
D (N=0)	0	0	0	0

Legenda: A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos; M- mucóide; NM- não mucóide; H- Hemolítico; NH- não hemolítico; N- número total de clones.

2.2.4. Identificação dos clones dominantes

Houve dominância por parte de nove clones distintos nesta fase e local de colheita (Tabela 22). Uma das cadelas apresentou quatro clones com igual número de amostras pelo que nenhum foi considerado dominante. Todas as outras cadelas demonstraram dominância de apenas um clone. À excepção de um clone (de GF A), todos os dominantes pertenciam ao GF B2 (89%, $p < 0,01$).

Tabela 22-Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs

Grupos Filogenéticos	% clones dominantes (N=9)	% clones não dominantes (N=9)
A	11,1 (n=1)	22,2 (n=2)
B1	0 (n=0)	22,2 (n=2)
B2	88,9 (n=8)	55,6 (n=5)
D	0 (n=0)	0 (n=0)

Legenda: A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos; N- número total de clones dominantes/não dominantes

2.2.5. Identificação e caracterização de amostras pauciclonaes e multiclonaes

Um total de nove amostras de origem vaginal foi caracterizado como pauciclonaal, com um total de 12 clones (Tabela 20). A única amostra classificada como multiclonaal tinha seis clones. Clones do GF B2 estiveram presentes em todas as amostras. O grupo B1 foi associado apenas à amostra multiclonaal (p= NS). O GF A esteve associado a uma amostra pauciclonaal e à amostra multiclonaal (11% vs. 100%, respectivamente; p= NS).

3. CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* OBTIDOS NA FASE DE ESTRO E DIESTRO

3.1. Isolados de *E. coli* de origem fecal e vaginal

Das 120 zaragatoas obtidas de 30 cadelas diferentes, obteve-se um total de 772 isolados. A distribuição destes isolados pelos animais em estudo encontra-se representada na Tabela 23.

Tabela 23- Número de isolados de *E. coli* de origem fecal e vaginal em estro e diestro.

Nº de isolados de <i>E. coli</i> /cadela	Nº de cadelas	Total de isolados
≤3	0	0
4	2	8
5	0	0
6	2	12
7	3	21
8	3	24
9	3	27
10	68	680
Total	30	772

3.1.1. Caracterização fenotípica dos isolados

Fazendo uma avaliação geral dos resultados, constatou-se que o fenótipo mais prevalente foi o não mucóide e não hemolítico (n=491) (64%; $p < 0,0001$). O fenótipo não mucóide e hemolítico apresenta menor prevalência (n=264), seguido do fenótipo mucóide e não hemolítico (n=17).

3.1.2. Prevalência dos grupos filogenéticos e sua associação com o fenótipo

Os quatro GF distribuíram-se, por ordem decrescente de prevalência, da seguinte forma: B2 (56%), A (21%), B1 (16%) e D (7%) (Tabela 24). De notar que mais de metade da amostragem foi composta por isolados de filogenia B2 ($p < 0,0001$), e 90% (n=27) das cadelas apresentaram bactérias deste grupo.

Os isolados do GF B2 apresentaram maioritariamente (61%) fenótipo não mucóide e hemolítico (n=263) ($p < 0,0001$). Os GF A e D são constituídos na sua maioria por bactérias de fenótipo não mucóide e não hemolítico (n=157 e n=53, respectivamente). O grupo B1 é exclusivamente formado por amostras não mucóides e não hemolíticas (n=120).

Tabela 24- Associação entre GFs e fenótipo dos isolados de origem fecal e vaginal em estro e diestro

	% Cadelas (N=30)	% isolados (N=772)	% M + H	% M + NH	% NM + H	% NM + NH
A	56,7 (n=17)	21,4 ^b (n=165)	0 (n=0)	4,8 (n=8)	0 (n=0)	95,2 (n=157)
B1	56,7 (n=17)	15,5 ^c (n=120)	0 (n=0)	0 (n=0)	0 (n=0)	100 (n=120)
B2	90,0 (n=27)	56,0^a (n=432)	0 (n=0)	1,6 (n=7)	60,9 * (n=263)	37,5 ^{**} (n=162)
D	36,7 (n=11)	7,1 ^d (n=55)	0 (n=0)	3,6 (n=2)	0 (n=0)	96,4 (n=53)

Legenda: M- mucóide, NM- não mucóide, H- hemolítico, NH- não hemolítico. A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos. ^{a,b} p <0,0001; ^{b,c} p <0,01; ^{c,d} p <0,0001; *** p <0,001

3.1.3. Identificação dos clones e associação com os grupos filogenéticos

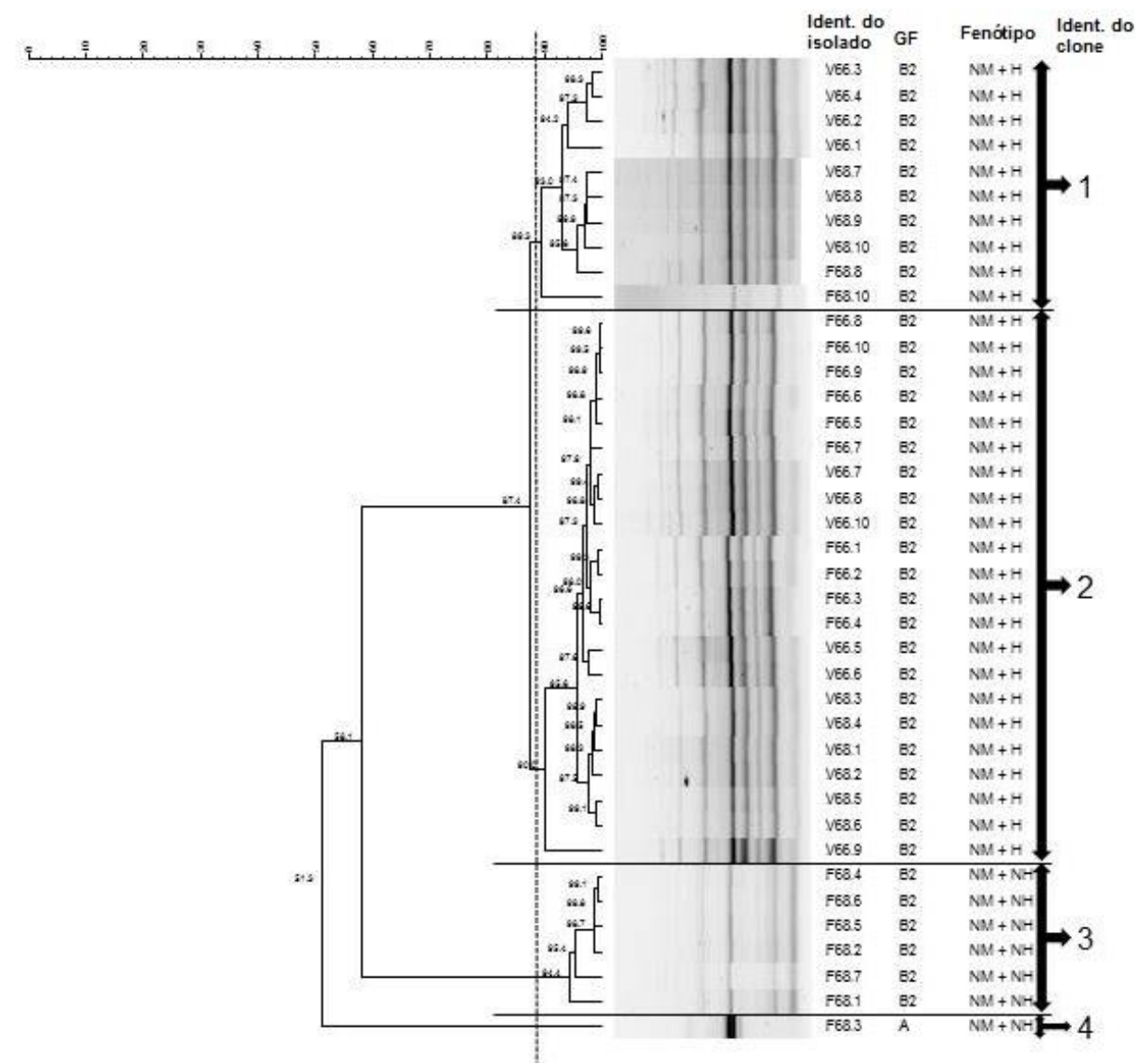
Dos 772 isolados obtidos, foram identificados 190 clones, com uma média de 6,3 clones por cadela (limite 1-16) (Tabela 25). Três cadelas (10%) mantiveram a presença de apenas um clone (B2) nas duas fases do ciclo. Cerca de 13% (n=4) das cadelas apresentou dois clones distintos, sendo mais de metade desses clones do GF B2. As demais cadelas (≈ 77%) tiveram mais de dois clones, pertencentes à mesma filogenia ou de GFs distintos.

A Figura 2 é representativa de uma amostra na qual um mesmo clone foi isolado a partir de zaragatoas vaginais e rectais colhidas em estro e diestro.

A presença de um clone na microbiota vaginal na fase de diestro está associada à sua presença em estro, também na microbiota vaginal, com uma razão de verossimilhança (*odds ratio*) de 76,98 (IC 95% [9,2-641,9]; p <0,001).

A presença de clones B2 na microbiota fecal em estro está associada à presença do mesmo clone em diestro, também na microbiota fecal, com uma razão de verossimilhança (*odds ratio*) de 28,89 (IC 95% [1,9-434,5]; p <0,05).

Figura 2- Dendrograma representativo de uma amostra pauciclinal (quatro clones) com 20 isolados de origem vaginal e 18 de origem fecal, pertencentes ao GF B2 distribuídos por três clones, e um isolado de origem fecal do GF A



Legenda- GF- Grupos filogenéticos; F66.1 a F66.10- isolados de origem fecal em estro; V66.1 a V66.10- isolados de origem vaginal em estro; F68.1 a F68.10- isolados de origem fecal em diestro; V68.1 a V68.10- isolados vaginais em diestro. O grau de semelhança entre os clones (%) é mostrado na escala. A linha vertical pontilhada representa o nível de corte de similaridade de 88,9%.

Tabela 25- Distribuição dos 190 clones de *E. coli* de origem fecal e vaginal entre as 30 cadelas em estro e diestro.

Identificação do animal		Clones															
Pauciclonal	1	B2 (20)															
	4	B2 (20)															
	40	B2 (19)															
	11	B1 (7)	B2 (23)														
	12	B2 (14)	B2 (6)														
	13	A (10)	B2 (10)														
	39	B1 (10)	B2 (10)														
	2	A (9)	B1 (10)	B1 (1)													
	5	A (10)	A (9)	B2 (1)													
	7	A (3)	A (2)	B2 (26)													
	46	B2 (18)	B2 (1)	B2 (1)													
	52	B1 (9)	B2 (10)	B2 (1)													
	66	A (1)	B2 (32)	B2 (6)													
	9	B2 (10)	B2 (7)	B2 (2)	B2 (1)												
Multiclonal	20	A (10)	A (2)	B1 (2)	B1 (2)	B2 (1)											
	43	B1 (4)	B1 (1)	B2 (21)	B2 (4)	B2 (1)											
	42	B1 (3)	B2 (10)	B2 (3)	B2 (1)	D (2)	D (1)										
	44	A (5)	B2 (9)	B2 (3)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)										
	25	B2 (5)	B2 (3)	B2 (2)	D (4)	D (3)	D (2)	D (1)									
	8	A (10)	B2 (15)	B2 (5)	B2 (3)	B2 (2)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)								
	51	B1 (4)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (28)	B2 (2)							
	10	A (5)	A (5)	A (2)	A (1)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (1)	B2 (1)	D (2)	D (1)						
	17	A (9)	A (3)	A (1)	B1 (1)	B1 (1)	D (10)	D (2)	D (1)	D (1)	D (1)						
	49	A (5)	A (1)	A (1)	B1 (3)	B1 (3)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (17)	D (1)					
	34	A (4)	A (2)	A (1)	A (1)	B1 (3)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	D (2)	D (1)				
	47	A (6)	A (1)	A (1)	B1 (5)	B1 (2)	B1 (1)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)	D (3)				
	21	A (5)	A (4)	A (2)	A (1)	A (1)	A (1)	B1 (2)	B1 (2)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (4)	B2 (2)	D (1)			
	61	A (8)	B1 (2)	B1 (2)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (9)	B2 (1)	B2 (1)	D (1)	D (1)	D (1)	D (1)			
	6	A (4)	A (3)	A (1)	A (1)	A (1)	B1 (4)	B1 (2)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (1)	D (6)	D (2)	D (2)	D (1)		
	33	A (7)	A (4)	A (1)	A (1)	B1 (3)	B1 (2)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B1 (1)	B2 (7)	B2 (1)	B2 (1)	B2 (1)	D (1)

Legenda- Cada cadela está representada por uma linha de caixas (clones). Em cada caixa encontra-se a indicação do GF (assinalados a diferentes cores) e número de isolados do respectivo clone.

Fazendo uma avaliação global do fenótipo e do GF dos diferentes clones, constatou-se que os clones pertencentes aos GF A, B1 e D eram majoritariamente pertencentes ao fenótipo não mucóide e não hemolítico ($p < 0,0001$ para cada GF) (Tabela 26). Os clones pertencentes à filogenia B2, apesar de terem apresentado três fenótipos diferentes, tinham maior número de clones dos fenótipos não mucóide e hemolítico e não mucóide e não hemolítico.

Tabela 26- Distribuição do número de clones por fenótipo e filogenia em estro e diestro

	Nº cadelas	Nº clones M + NH	Nº clones NM + H	Nº clones NM + NH
A (N=44)	17	4	0	40
B1 (N=56)	17	0	0	56
B2 (N=63)	27	1	26	36
D (N=27)	11	1	0	26

Legenda: A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos; M- mucóide; NM- não mucóide; H- Hemolítico; NH- não hemolítico; N- número total de clones.

3.1.4. Identificação dos clones dominantes

Um total de 26 clones dominantes e 164 não dominantes foi isolado. Relativamente a outros GF, mais clones do GF B2 foram classificados como dominantes (69,2%; $p < 0,0001$) do que não dominantes (27,4%) (Tabela 27).

Tabela 27- Associação entre clones dominantes e não dominantes e os GFs

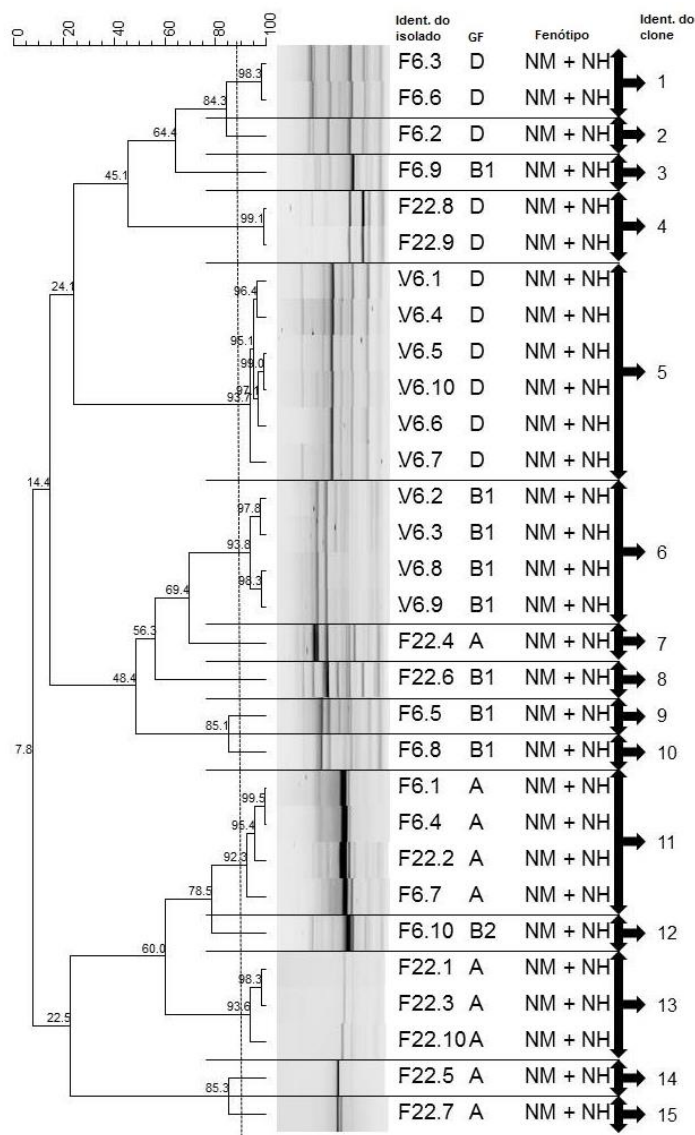
Grupos Filogenéticos	% clones dominantes (N=26)	% clones não dominantes (N=164)
A	19,2 (n=5)	23,8 (n=39)
B1	3,8 (n=1)	33,5 (n=55)
B2	69,2 (n=18)	27,4 (n=45)
D	7,7 (n=2)	15,2 (n=25)

Legenda: A, B1, B2 e D- grupos filogenéticos; N- número total de clones dominantes/não dominantes

Relativamente ao GF B2, constatou-se que os clones dominantes pertencentes ao fenótipo hemolítico são mais prevalentes ($p < 0,05$).

Verificou-se que nas situações em que os isolados do GF B2 não estavam associados a clones dominantes, estavam representados em pequeno número constituindo clones não dominantes, como exemplificado na Figura 3.

Figura 3- Dendrograma representativo de uma amostra com 20 isolados de origem fecal e 10 de origem vaginal pertencentes aos diferentes GF

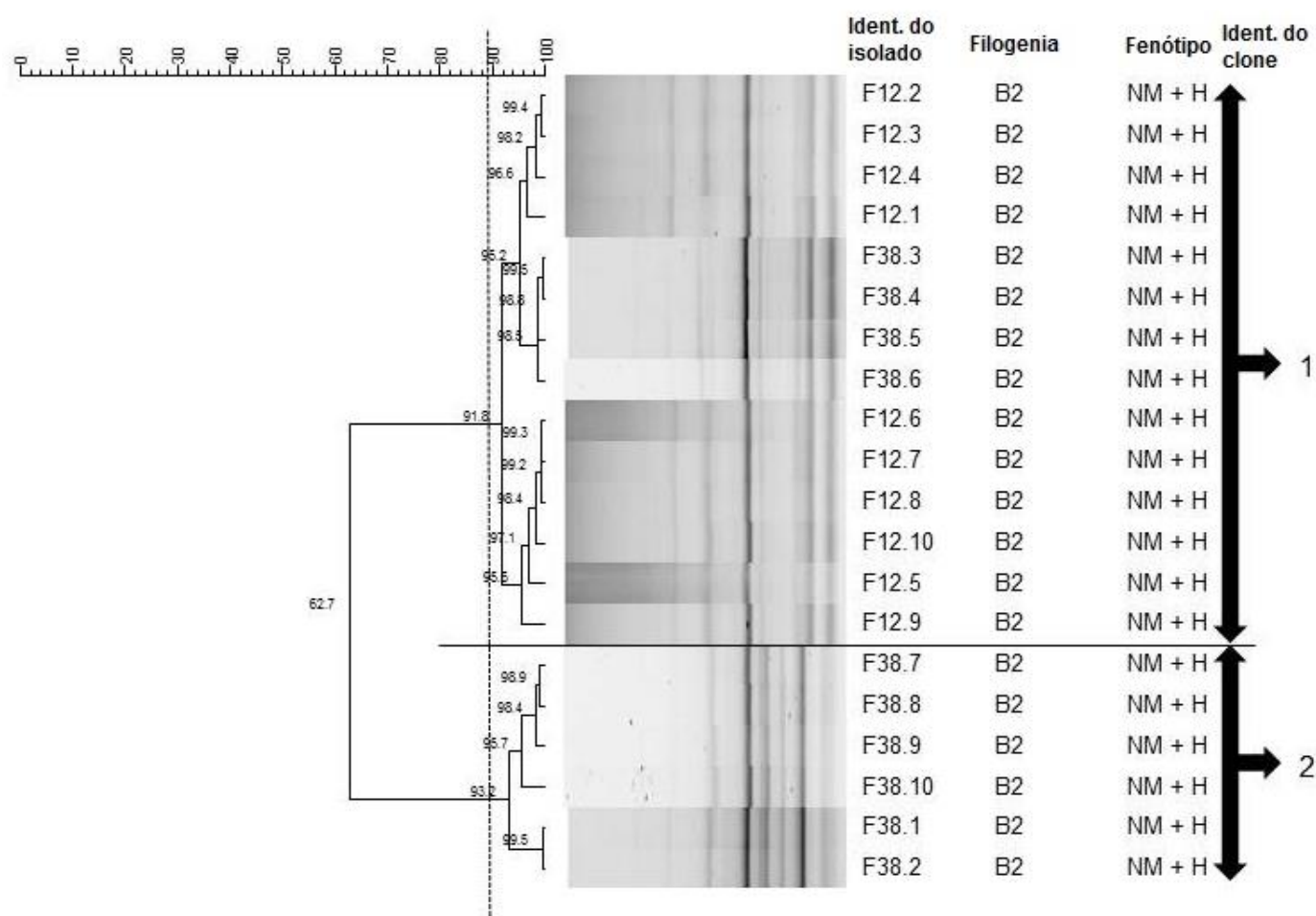


Legenda- F6.1 a F6.10- isolados de origem fecal em estro; V6.1 a V6.10- isolados de origem vaginal em estro; F22.1 a F22.10- isolados de origem fecal em diestro. O grau de semelhança entre os clones (%) é mostrado na escala. A linha vertical pontilhada representa o nível de corte de similaridade de 88,9%.

3.3.5. Identificação e caracterização de amostras pauciclonaes e multiclonaes

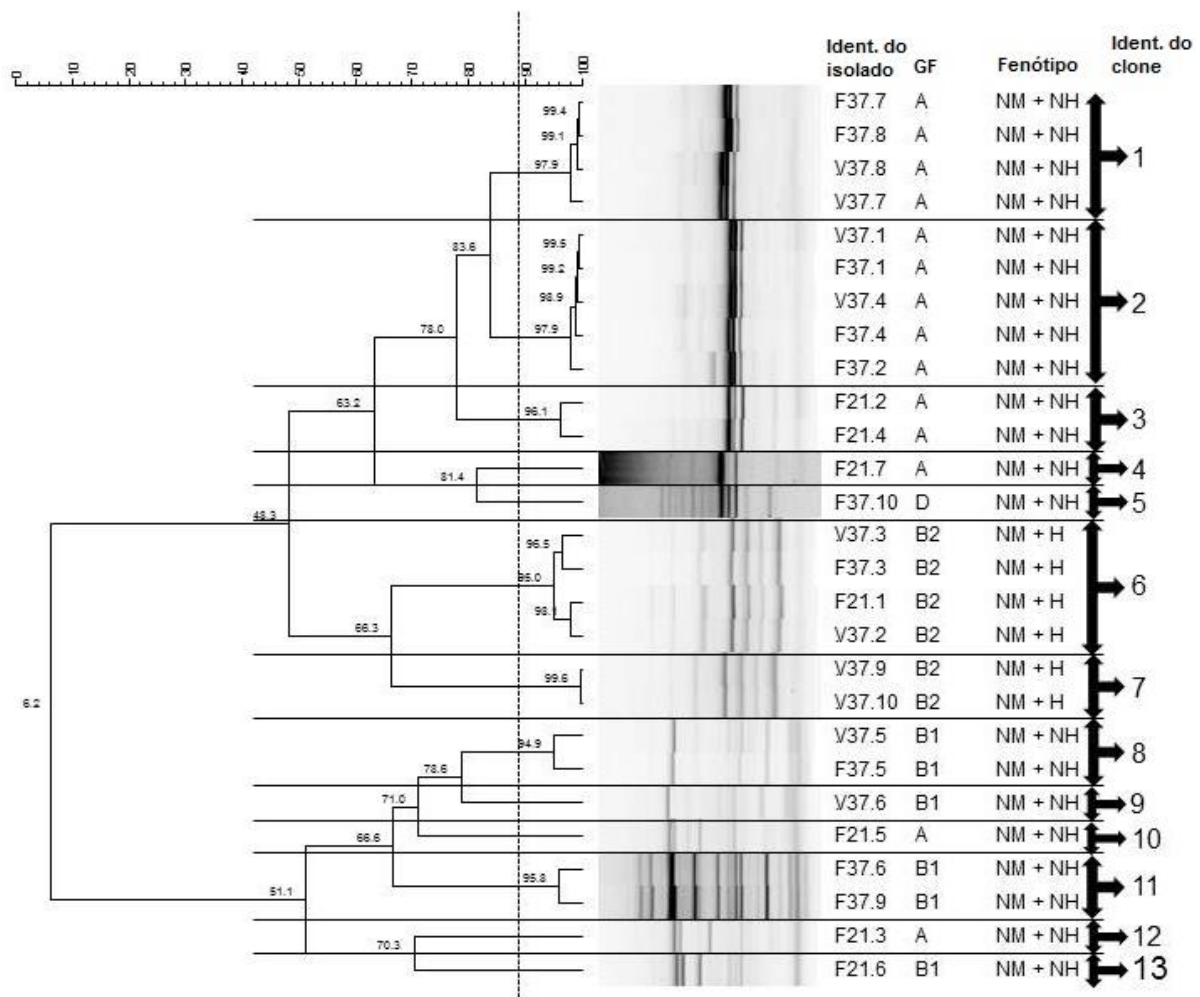
Um total de 14 amostras foi caracterizado como pauciclonaal, com um total de 33 clones (Tabela 25). As restantes 16 amostras foram classificadas como multiclonaes, com um total de 157 clones. A Figura 4 exemplifica o dendrograma de uma amostra pauciclonaal, e a Figura 5 o de uma amostra multiclonaal.

Figura 4- Dendrograma representativo de uma amostra pauciclonaal (dois clones) com 20 isolados de origem fecal pertencentes ao GF B2



Legenda- F12.1 a F12.10- isolados de origem fecal em estro; F38.1 a F38.10- isolados de origem fecal em diestro. O grau de semelhança entre os clones (%) é mostrado na escala. A linha vertical pontilhada representa o nível de corte de similaridade de 88,9%.

Figura 5- Dendrograma representativo de uma amostra multiclonal (13 clones) com 17 isolados de origem fecal e 10 isolados de origem vaginal pertencentes aos vários GF



Legenda- F21.1 a F21.7- isolados de origem fecal em estro; F37.1 a F37.10- isolados de origem fecal em diestro; V37.1 a V37.10- isolados vaginais em diestro. O grau de semelhança entre os clones (%) é mostrado na escala. A linha vertical pontilhada representa o nível de corte de similaridade de 88,9%.

Clones do GF B2 foram significativamente mais prevalentes entre amostras pauciclônicas do que multiclonais (64% vs. 27%, respectivamente, $p < 0,0001$). Contrariamente, o grupo D foi significativamente associado a amostras multiclonais (17% vs. 0% de amostras pauciclônicas, $p < 0,01$). Os GFs A e B1 foram associados de forma semelhante a amostras pauciclônicas e multiclonais (GF A: 21% vs. 24%, respectivamente, $p = \text{NS}$; GF B1: 15% vs. 33%, respectivamente, $p = \text{NS}$).

As amostras pauciclônicas foram mais prevalentes nas amostras de origem vaginal (EV= 91%; DV= 90%) do que nas amostras de origem fecal (EF= 53%; DF= 37%) ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A microbiota intestinal das cadelas constitui um importante reservatório de *E. coli* que causam infecções extra-intestinais como as infecções do trato urinário (ITU) e a piómetra (Hagman, 2012; Windahl, Holst, Nyman, Grönlund, & Bengtsson, 2014). *E. coli* uropatogénica (UPEC) é a bactéria mais frequentemente isolada nas ITU (53,9-68%) com aproximadamente 14% dos cães a apresentarem pelo menos um episódio de ITU durante a sua vida (Windahl, Holst, Nyman, Grönlund, & Bengtsson, 2014). Cerca de 25% das cadelas intactas em diestro com menos de 10 anos desenvolvem piómetra (Hagman, 2012) e em 80-90% dos casos as estirpes de *E. coli* isoladas apresentam características genómicas semelhantes às UPEC (Mateus *et al.*, 2013). No entanto, ainda não está bem definido se a patogenicidade destas estirpes está associada à sua maior prevalência na microbiota fecal ou a um maior potencial de virulência.

Neste estudo avaliámos a importância relativa da abundância fecal e vaginal de *E. coli* em 30 cadelas saudáveis. Foi estudado um grande número de isolados, cerca de 10 isolados por amostra fecal e 10 por amostra vaginal, num total de 772 isolados de *E. coli*. Tendo em conta a descrição da literatura, este é o primeiro estudo a ser feito em cadelas saudáveis, numa amostragem populacional de *E. coli* de origem fecal e vaginal do mesmo indivíduo, com o objectivo de estabelecer a relação entre GFs, clones dominantes e persistência nos diferentes tempos e locais de colheita. A estratégia utilizada permitiu analisar as variações na diversidade da população fecal e vaginal de *E. coli* num universo de 30 cadelas. A nossa análise mostrou que 10% das cadelas apresentaram um único clone no conjunto das diferentes amostragens, enquanto outras tiveram um número máximo de 16 clones distintos. Com esta diversidade clonal foi possível fazer uma classificação dicotómica das amostras, caracterizando-as como pauciclonais ou multiclonais (Moreno *et al.*, 2009). Desta forma, este estudo permitiu obter um conjunto de resultados interessantes: (1) os clones dominantes são maioritariamente do GF B2 (69,2%; $p < 0,0001$); (2) os clones do GF B2 foram significativamente mais prevalentes em amostras pauciclonais do que multiclonais (64% vs. 27%, respectivamente, $p < 0,0001$); (3) a presença de clones B2 na microbiota fecal em estro está associada à presença do mesmo clone em diestro, também na microbiota fecal, com uma razão de verosimilhança de 28,89 (IC 95% [1,9-434,5]; $p < 0,05$); (4) a presença de um clone na microbiota vaginal na fase de diestro está associada à sua presença em estro, também na microbiota vaginal, com uma razão de verosimilhança de 76,98 (IC 95% [9,2-641,9]; $p < 0,001$).

No nosso estudo, os isolados de *E. coli* pertencentes ao GF B2 foram os mais prevalentes em ambos os locais de colheita (fezes- 48,5%; vagina- 79,5%) e em ambas as fases (estro- 61,5%; diestro- 66,5%). Um estudo anterior da nossa equipa, em cadelas saudáveis, revelou uma prevalência ligeiramente inferior de isolados de origem fecal pertencentes ao GF B2

(39%) (Mateus *et al.*, 2013). Esta prevalência ligeiramente inferior poderá estar associada ao facto ter sido avaliado apenas um isolado por amostra. No entanto, os resultados deste trabalho corroboram o descrito em crianças e mulheres saudáveis em que o GF B2 foi o mais prevalente nas fezes (Moreno *et al.*, 2009; Nowrouzian, Wold, & Adlerberth, 2005; Zhang, Foxman, & Marrs, 2002).

Neste trabalho, os clones do GF B2 foram maioritariamente associados a amostras pauciclonaes e tendem a comportar-se como clones dominantes. O maior potencial de virulência associado ao GF B2 é amplamente conhecido (Mateus *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014). Apesar de não ter sido feita a análise da presença/ausência dos genes que codificam para factores de virulência, podemos assumir que os clones do grupo B2 dominantes e presentes em amostras pauciclonaes são os que também possuem maior número de genes que codificam para FVs. De facto, esta dominância do GF B2 em relação aos restantes GFs poderá ser indicativo da presença de factores bacterianos específicos, como adesinas e outros factores de virulência deste grupo, que contribuem para uma situação de *fitness* dentro da microbiota intestinal e vaginal. A situação de dominância dos clones B2 poderá ainda estar associada à produção de bacteriocinas por clones B2 que poderão eliminar clones não B2 (Moreno *et al.*, 2009). A presença de factores específicos do ambiente a colonizar que seleccionam estirpes com elevado potencial de virulência, e que por outro lado limitam a colonização por estirpes com baixo arsenal de virulência, poderá também ser uma explicação para a dominância dos clones B2.

No nosso estudo, os clones B2 na microbiota fecal em estro estiveram também associados à presença do mesmo clone em diestro, também na microbiota fecal, com uma razão de verosimilhança de 28,89. Isto sugere que, na cadela, as estirpes do GF B2 estão associadas à persistência na microbiota fecal. Nowrouzian *et al.* (2005) demonstraram que na microbiota intestinal de crianças, as estirpes do grupo B2 estiveram mais associadas à persistência na microbiota intestinal e apresentam uma maior capacidade de colonização do intestino. Tal não foi observado nos GF A e B1 (estirpes comensais), que estiveram mais associados à microbiota fecal considerada transiente (Nowrouzian, Wold, & Adlerberth, 2005). O conceito de persistência associado com o GF B2 ainda é mais evidente na microbiota vaginal, uma vez que a presença de um clone na microbiota vaginal na fase de diestro esteve associada à sua presença em estro, também na microbiota vaginal, com uma razão de verosimilhança de 76,98. Na vagina, cerca de 90,5% das amostras tinham isolados de *E. coli* do grupo B2, pelo que se presume que este ambiente, sendo mais selectivo que o intestinal, apenas permita a presença e a persistência da bactéria com maior número de FVs. Por outro lado, os clones B2, para além de melhor adaptados ao ambiente vaginal por possuírem mais factores de virulência/*fitness*, poderão ainda apresentar um maior sinergismo com os microrganismos ditos comensais da vagina, o que poderá explicar a sua maior capacidade de persistência.

Neste trabalho, os GFs A e B1 foram associados de forma semelhante a amostras pauciclonaes e multiclonais e, o grupo D esteve significativamente mais associado a amostras multiclonais, o que está relacionado com a maior diversidade de clones entre os dois tempos de colheita, nestes GFs.

De estro para diestro, houve uma diminuição na percentagem de amostras pauciclonaes, de origem fecal, de 53% para 37%. Uma justificação possível pode estar associada com o diferente ambiente hormonal entre as duas fases. Tem sido demonstrado que, noutras espécies, as hormonas sexuais desempenham um papel crucial na regulação da composição e estabilidade da microbiota vaginal (Romero *et al.*, 2014) e fecal (Org *et al.*, 2016). Embora o mecanismo de modelação da microbiota fecal/vaginal pelas hormonas permaneça por esclarecer, vários estudos demonstram que as hormonas esteróides têm um papel importante na modulação da interacção bactéria –hospedeiro (revisto por García-Gómez *et al.*, 2013).

Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que 94% dos isolados de *E. coli* obtidos de úteros de cadelas com piómetra pertenciam ao GF B2 (Mateus *et al.*, 2013) e que exibiam um maior número de genes que codificam para factores de virulência e de marcadores de ilhas de patogenicidade, o que lhes confere um maior potencial para colonizar o útero e estabelecer a infecção. A maior dominância e prevalência dos isolados do GF B2 nas fezes e na vagina observados em cadelas saudáveis poderá facilitar e aumentar as probabilidades de colonização da vagina e do útero em hospedeiros mais susceptíveis. O facto de amostras de origem fecal colhidas nas fases de estro e diestro serem mais heterogéneas (média de 3,3 clones/amostra) do que as amostras de origem vaginal (média de 1,7 clones/amostra), mostra que só determinados clones têm capacidade de aderir e persistir na mucosa vaginal. De igual modo, Zhang *et al.* (2002), mostraram que os isolados obtidos nos casos de ITU em mulheres (maioritariamente do grupo B2) tinham menor heterogeneidade do que os isolados de origem fecal.

Um dos factores de virulência que foi possível analisar no nosso estudo foi a capacidade hemolítica dos isolados de *E. coli*. Os isolados do GF B2 apresentaram maioritariamente fenótipo hemolítico. Mais importante, o número de clones dominantes do GF B2 com fenótipo hemolítico foi significativamente superior ao número de clones com fenótipo não hemolítico. Este resultado sugere que este factor pode ser determinante para a dominância dos isolados do GF B2 na microbiota fecal e vaginal. No entanto, a relevância do papel da hemolisina como factor preditivo de persistência na microbiota intestinal ainda é controversa (Nowrouzian *et al.*, 2005). Contudo, o seu papel na patogenia da piómetra diagnosticada em cadelas está estabelecido. O fenótipo hemolítico (e o gene *hlyA*) foi detectado em 35-52% dos isolados de *E. coli* em casos de piómetra (Chen *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2013). Recentemente, o nosso grupo de trabalho demonstrou que *E. coli* β-hemolítica esteve

associada a metrite e a uma maior destruição do endométrio, quando comparado com *E. coli* não hemolítica (Henriques *et al.*, 2014).

A maior novidade deste trabalho é que entre os clones de *E. coli* de origem fecal e vaginal, a pauciclonalidade das amostras e a dominância do clone dentro da amostra esteve associado estatisticamente ao GF com maiores características de virulência, o GF B2, reflectindo a convergência dos conceitos de maior virulência e de prevalência/dominância).

Os nossos resultados sugerem que antes da ocorrência de um episódio de piómetra, a cadela pode apresentar um aumento significativo na colonização fecal e vaginal com estipes de *E. coli* do GF B2.

No que diz respeito às limitações do trabalho, é importante referir que as colheitas foram feitas em apenas duas fases do ciclo éstrico. Seria interessante caracterizar a fase de anestro, bem como voltar a analisar as diferentes fases no ciclo éstrico seguinte. Desta forma um seguimento a longo prazo das cadelas em estudo iria permitir perceber se as cadelas das quais foram isolados clones dominantes do GF B2 da vagina e de fezes desenvolvem a doença mais tarde. Para além disso, a técnica de tipagem idealmente utilizada para tipificação genómica seria a electroforese em gel em campo pulsado (PFGE). Mas uma vez que se tratava de um estudo com um grande número de isolados, tornar-se-ia uma técnica monetariamente dispendiosa. A análise genómica dos FVs também poderia ter sido uma mais-valia para o nosso trabalho, mas que implicaria mais tempo, bem como mais custos. Outra limitação deste estudo reflecte-se no facto das cadelas serem jovens, com uma média de idade de 3,6 anos. Seria interessante fazer um estudo semelhante numa população com uma idade superior.

CONCLUSÃO

Como conclusão, os nossos resultados indicam que, em cadelas saudáveis, a população de *E. coli* da microbiota fecal varia consideravelmente entre hospedeiros, no que diz respeito à diversidade clonal e distribuição filogenética. Os clones de *E. coli* do GF B2 foram mais comuns nas amostras pauciclônicas e tendem a comportar-se como clones dominantes. O facto de este GF estar associado a um maior potencial de virulência, leva-nos a sugerir que a trilogia constituída pela pauciclonalidade/maior dominância/maior potencial de virulência está relacionada com a maior probabilidade dos clones do GF B2 causarem piómetra em hospedeiros susceptíveis.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, L. N., Price, L. B., & Graham, J. P. (2015). An exploratory study of dog park visits as a risk factor for exposure to drug-resistant extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). *BMC Research Notes*. DOI:10.1186/s13104-015-1103-2
- Arora, N., Sandford, J., Browning, G. F., Sandy, J. R., & Wright, P. J. (2006). A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 66(6–7), 1530–1536. DOI:10.1016/j.theriogenology.2006.02.019
- Baponi, S., Taravati, A., & Dilmagani, M. (2016). Determination of phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from human urine in urmia city. *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*, 3(3), 97–99.
- Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., & Dozois, C. M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 62, 1–10. DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2011). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*, 2012. DOI:10.1155/2012/681473
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., & Denamur, E. (1998). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 177, 642–650.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Mora, A., Balsalobre, C., Munoa, F., Juarez, A., Blanco, J. (1997). Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins production of toxins. *Research in Microbiology*, 148, 745–755.
- Chen, Y. M. M., Wright, P. J., Lee, C.-S., & Browning, G. F. (2003). Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Veterinary Microbiology*, 94, 57–69. DOI:10.1016/S0378-1135(03)00063-4
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. DOI:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.Updated
- Davis, C. P., Cleven, D., Balish, E., & Yale, C. E. (1977). Bacterial association in the gastrointestinal tract of beagle dogs. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 194–206.
- Dobrindt, U., & Hacker, J. (2008). Targeting virulence traits : potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. *Microbiology*, 11, 409–413. DOI:10.1016/j.mib.2008.09.005
- Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J., & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 3108–3110. DOI:10.1128/JCM.01468-12

Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., ... Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 147, 1671–1676.

Emödy, L., Kerényi, M., & Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 29–33. DOI:10.1016/S0924-8579(03)00236-X

Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., Bui, H., Le Bouguénec, C., & Denamur, E. (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *molecular biology and evolution*, 21(6), 1085–1094. DOI:10.1093/molbev/msh118

Fabbri, A., Travaglione, S., & Fiorentini, C. (2010). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): toxin biology, in vivo applications and therapeutic potential. *Toxins*, 2, 283–296. DOI:10.3390/toxins2020283

Fransson, B. A. (2003). *Systemic inflammatory response in canine pyometra the response to bacterial uterine infection*. Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Suécia.

García-gómez, E., González-pedrajo, B., & Camacho-arroyo, I. (2013). Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *BioMed Research International*.

Goñi, F. M., & Ostolaza, H. (1998). *E. coli* α -hemolysin: a membrane-active protein toxin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31, 1019–1034.

Groppetti, D., Pecile, A., Barbero, C., & Martino, P. A. (2012). Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches : Role on fertility. *Theriogenology*, 77, 1549–1556. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.11.022

Hagman, R. (2004). *New aspects of canine pyometra: studies on epidemiology and pathogenesis*. Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Suécia.

Hagman, R. (2012). Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 323–325. DOI:10.1111/rda.12031

Hagman, R., & Kühn, I. (2002). *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 84(1–2), 143–153. DOI:10.1016/S0378-1135(01)00449-7

Henriques, S., Silva, E., Lemsaddek, A., Lopes-da-Costa, L., & Mateus, L. (2014). Genotypic and phenotypic comparison of *Escherichia coli* from uterine infections with different outcomes: Clinical metritis in the cow and pyometra in the bitch. *Veterinary Microbiology*, 170(1–2), 109–116. DOI:10.1016/j.vetmic.2014.01.021

Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M., & Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded-DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172(11), 6175–6181.

Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80–128.

Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 261–72. DOI:10.1086/315217

- Johnson, J. R., Stell, A. L., & Delavari, P. (2001). Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69(3), 1306–1314. DOI:10.1128/IAI.69.3.1306
- Jonas, D., Spitzmuller, B., Weist, K., Ruden, H., & Daschner, F. D. (2002). Comparison of PCR-based methods for typing *Escherichia coli*. *Clinical microbiology and infection*, 9, 823–831. DOI:10.1046/j.1469-0691.2003.00661.x
- Jones, C.H., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Nicholes, A.V., Abraham, S.N., and Hultgren, S.J. (1995) FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 2081–2085
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*. DOI:10.1038/nrmicro818
- Köhler, C., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 642–647. DOI: 10.1016/j.ijmm.2011.09.006
- Kustritz, M. V. R. (2006). Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology*, 66, 567–574. DOI:10.1016/j.theriogenology.2006.05.003
- Liu, P. Y., & Wu, W. (1997). Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 28, 19–28.
- Mateus, L., Henriques, S., Merino, C., Pomba, C., Lopes da Costa, L., & Silva, E. (2013). Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. *Veterinary Microbiology*, 166(3–4), 590–594. DOI:10.1016/j.vetmic.2013.07.018
- Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 413–451. DOI:10.1128/MMBR.00012-07
- Miyazaki, J., Ba-Thein, W., Kumao, T., Yasuoka, M. O., Akaza, H., & Hayashi, H. (2002). Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesion I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 33(1), 23-26.
- Moreno, E., Johnson, J. R., Pérez, T., Prats, G., Kuskowski, M. A., & Andreu, A. (2009). Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes and Infections*, 11, 274–280. DOI:10.1016/j.micinf.2008.12.002
- Moriel, D. G., Rosini, R., Seib, K. L., Serino, L., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2012). *Escherichia coli*: great diversity around a common core. *mBio*, 3(3), e00118-12.
- Nam, Eui-Hwa, Ko, S., Chae, J., & Hwang, C. (2013). Characterization and zoonotic potential of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs. *J. Microbial Biotechnology*, 23(3), 422–429.
- Nowrouzian, F. L., Wold, A. E., & Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *The Journal of Infectious Diseases*, 191, 1078–1083.

Olive, D. M., & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1661–1669.

Olson, P. N.S., Mather, E.C. (1978). Canine vaginal and uterine bacterial flora. *JAVMA* 172 (6), 708–711.

Org, E., Mehrabian, M., Parks, B. W., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T. A. & Lusi, A. J. (2016): Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice, *Gut Microbes*, DOI: 10.1080/19490976.2016.1203502

Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., ... Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67(2), 546–553.

Picard, B., Picard-Pasquier, N., Krishnamoorthy, R., & Goullet, P. (1991). Characterization of highly virulent *Escherichia coli* strains by ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 82, 183–188.

Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635–700.

Romero, R., Hassan, S. S., Gajer, P., Tarca, A. L., Fadrosh, D. W., Nikita, L., ... Ravel, J. (2014). The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*, 2, 1–19.

Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753–1754.

Silva, E., Leitão, S., Tenreiro, T., Pomba, C., Nunes, T., Lopes-da-Costa, L., & Mateus, L. (2009). Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 6000–6010. DOI: 10.3168/jds.2009-2358

Silva, L. D. M., Onclin, K., & Verstegen, J. P. (1995). Cervical opening in relation to progesterone and oestradiol during heat in beagle bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*, 104, 85–90. DOI:10.1530/jrf.0.1040085

Siqueira, A. K., Ribeiro, M. G., Leite, D. da S., Tiba, M. R., Moura, C. de, Lopes, M. D., ... Silva, A. V. da. (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86, 206–210. DOI:10.1016/j.rvsc.2008.07.018

Smith, H. W., & Crabb, W. E. (1961). The fecal bacterial flora of animals and man : its development in the young. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 82, 53–66.

Sousa, C. P. (2006). The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12(3), 363–373.

Spratt, B. G. (2004). Exploring the concept of clonality in bacteria. In N. W. and A. Johnson (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 266, pp. 323–352). Totowa, NJ.

- Srivastava, R., Agarwal, J., Srivastava, S., & Mishra, B. (2014). Role of special pathogenicity versus prevalence theory in pathogenesis of acute cystitis caused by *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 63, 1038–1043. DOI:10.1099/jmm.0.073270-0
- Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. T. (2015). Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–6831. DOI:10.1093/nar/19.24.6823
- Watts, J. R., Wright, P. J., & Whithear, K. C. (1996). Uterine , cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *Journal of Small Animal Practice*, 37, 54–60. DOI:10.1111/j.1748-5827.1996.tb01936.x
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85, 11–19. DOI:10.1016/j.yexmp.2008.03.007
- Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). Capsule and lipopolysaccharide. In M. S. Donnenberg (Ed.) *Escherichia coli: Pathotypes and principles of pathogenesis* (2^a ed, pp. 533-556). London, UK: Elsevier
- Windahl, U., Holst, B. S., Nyman, A., Grönlund, U., & Bengtsson, B. (2014). Characterisation of bacterial growth and antimicrobial susceptibility patterns in canine urinary tract infections. *BMC Veterinary Research*, 10:217, 1–10. DOI:10.1186/s12917-014-0217-4
- Zhang, L., Foxman, B., & Marrs, C. (2002). Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 3951–3955. DOI:10.1128/JCM.40.11.3951